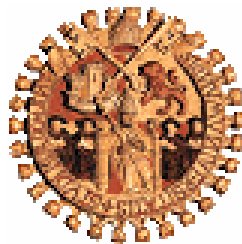


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Fisiología y Farmacología



**EFEECTO DE N-ACETILCISTEÍNA Y
GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA EXPRESIÓN DE
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y QUIMIOCINAS
DURANTE LA PANCREATITIS AGUDA EDEMATOSA Y
NECROTIZANTE**

Sara Yubero Benito

Salamanca, Marzo 2010



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por Dña. Sara Yubero Benito para optar al grado de Doctor en Biología, con el título “Efecto de N-Acetilcisteína y Glucocorticoides sobre la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas durante la pancreatitis aguda edematosa y necrotizante”, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Dña. Isabel de Dios Bayón y D. Manuel A. Manso Martín, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma el presente en Salamanca, a 10 de Marzo de dos mil diez.

Fdo. Rafael Jiménez Fernández



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

Dña. ISABEL de DIOS BAYÓN y D. MANUEL A. MANSO MARTÍN, Profesores Titulares de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por Dña. Sara Yubero Benito, con el título de “Efecto de N-Acetilcisteína y Glucocorticoides sobre la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas durante la pancreatitis aguda edematosa y necrotizante”, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente en Salamanca,
a 10 de Marzo de dos mil diez.

Fdo. Isabel de Dios Bayón

Fdo. Manuel A. Manso Martín

Este trabajo ha sido realizado con cargo a Proyectos de Investigación subvencionados por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI05/0025) y por el ISCIII (PI08/0035), con la ayuda de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por la Junta de Castilla-León, y por un contrato de personal investigador en prácticas de la Universidad de Salamanca.

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral no hubiera podido ser realizada sin la colaboración técnica y apoyo de un gran número de personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

A mis directores Maribel y Manolo, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación, dedicando su tiempo en mi formación científica que sin duda será crucial para mi futuro. Gracias por la paciencia y confianza que me habéis mostrado durante estos años, ha sido todo un placer formar parte de esta “pequeña familia”, me llevo una gran amistad.

A mi compañera Laura, por los buenos y los no tan buenos momentos que hemos compartido. Por su paciencia y ayuda sin la cual este trabajo no hubiera llegado a su fin, parte de esta tesis es también tuya. A Andrés, por estar siempre pendiente de nuestro trabajo, compartiendo esos pequeños ratitos de café. A nuestro técnico Javi, siempre dispuesto a echar una mano haciendo con su simpatía más ameno el trabajo de los miércoles.

Al servicio de Citometría de Flujo de la Universidad de Salamanca, a Martín, por haberme ayudado en mi inicio en el mundo de la citometría. Al departamento de Biología Celular y Patología, en especial a Eduardo Weruaga y a Javier Sánchez, por su gran ayuda para elaborar y preparar minuciosamente los trabajos de histología.

Quiero dedicar esta tesis a Dani, por saber animarme y comprenderme en todo momento, gracias por estar a mi lado. También a mis hermanos y “sobris”, porque a pesar de la distancia son una parte imprescindible de mi vida, soy afortunada por tener esta gran familia.

Finalmente y de forma muy especial, quiero dedicar este trabajo a mis padres, porque gracias a ellos he podido llegar hasta aquí. Gracias por vuestro apoyo y cariño, es todo un orgullo ser vuestra hija, esta tesis es para vosotros.

A mis padres

Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la Varianza
AP-1	“Activator Protein 1”
ARDS	“Acute Respiratory Distress Syndrome”
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ATP	Adenosín-trifosfato
CARS	“Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome”
CAT	Catalasa
CCK	Colecistoquinina
CD	“Cluster of Differentiation”
CDE	Dieta deficiente en colina y suplementada con etionina
CINC	“Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant”
CRP	Proteína C Reactiva
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DSP	Fosfatasa de especificidad dual
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
Dx	Dexametasona
EDTA	Etilendiamina-ácido tetraacético
EGF	“Epidermal Growth Factor”
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
ERK 3/4	“Extracellular signal Regulated Kinase 3 y 4”
ERK 5	“Extracellular signal Regulated Kinase 5”
ERK1/2	“Extracellular signal Regulated Kinase 1 y 2”
ESL-1	Ligando-1 E-selectina
Fl₂	Fluorescencia naranja
Fl₃	Fluorescencia roja
FSC	“Forward light Scatter”
GC	Glucocorticoide

GDOC	Ácido Glycodeoxicólico
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GSH	Glutación reducido
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HAT	Histona acetil transferasa
HCl	Ácido Clorhídrico
HDTAB	Hexadeciltrimetilamonibromuro
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM-1	“Intercellular Adhesión Molecule 1”
ICE	“Interleukin-1 Converting Enzyme”
IgG	Inmunoglobulina G
IKK	I κ B kinasa
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF-γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IκB	“Inhibitor of kappa B”
JAK	“Janus Kinase”
JNK/SAPK	“Jun N-terminal Kinase or Stress-Activated Protein Kinase”
KDa	KiloDalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LFA-1	“Leukocyte Function-Associated Antigen-1”

LPS	Lipopolisacárido
Lyso-PC	Lysofosfatidilcolina
MAPK	“Mitogen Activated Protein Kinase”
MCP-1	“Monocyte Chemotactic Protein 1”
MEK	“Mitogen ERK Kinase”
MKK	“MAPK kinase”
MKKK	“MAPK kinase kinase”
MKP	“MAPK fosfatase”
MODS	Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple
MPO	Mieloperoxidasa
NAC	N-Acetilcisteína
NAD⁺	Nicotinamido-adenín-dinucleótido, forma oxidada
NADH	Nicotinamido-adenín-dinucleótido, forma reducida
NADPH	Nicotinamido-adenín-dinucleótido fosforilado, forma reducida
NF-κB	“Nuclear Factor κ B”
NO	Óxido Nítrico
OBP	Obstrucción Bilio-Pancreática
ONOO⁻	Peroxinitrito
PA	Pancreatitis Aguda
PAAF	“Pancreatitis-Associated Ascitic Fluid”
PAF	“Platelet Activating Factor”
PAF-AH	“Platelet Activating Factor Acetilhydrolase”
PBS	Solución amortiguadora fosfato 0,1 M pH 7,4, con 150 mM ClNa
PDGF	“Platelet Derived Growth Factor”
PDTC	Pirrolidina ditiocarbonato
PE	Ficoeritrina
PE/Cy5	Ficoeritrina/Cianina 5
PECAM-1	“Platelet-Endothelial Cell Adhesión Molecule 1”
PKC	Proteína kinasa C

PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PMCA	“Plasma Membrane Calcium Pump”
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
PPP	Proteína serina/treonina fosfatasa
PSGL-1	Ligando P-selectina-1
PTC	Procalcitonina
PTK	Proteína tirosina kinasa
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
RANTES	“Regulated on Activation in Normal T cell-Expressed and Secreted”
RE	Retículo Endoplasmático
Ref-1	“Redox factor 1”
RHD	“Rel Homology Domain”
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”
SAA	Proteína Sérica Amiloide A
SDS	Lauril sulfato
SERCA	“Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium” pump
SIRS	Respuesta Inflamatoria Sistémica
SOCS	“Supressor of Cytokine Signalling”
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	Side light Scatter
STAT	“Signal Transducers and Activators of Transcription”
STI	Inhibidor de la tripsina
TAD	“Transactivation Domain”
TAP	Péptido Activador de Tripsinógeno
TcNa	Taurocolato Sódico
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNFR	Receptor de TNF- α
TNF-α	“Tumor Necrosis Factor alpha”
VCAM-1	“Vascular Cell Adhesión Molecule 1”

Índice

1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Mecanismos patogénicos	9
2.1.1. Activación prematura de enzimas digestivas	10
2.1.2. Alteraciones en la homeostasis del calcio	11
2.1.3. Colecistoquinina (CCK)	12
2.1.4. Aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS)	13
2.2. Respuesta Inflamatoria	14
2.2.1. Respuesta inflamatoria local	15
2.2.1.1. Vías de señalización implicadas en la expresión de factores inflamatorios	15
2.2.1.1.A. MAPKs	15
2.2.1.1.B. NF- κ B	17
2.2.1.1.C. STAT	18
2.2.1.1.D. AP-1	20
2.2.1.2. Mediadores inflamatorios	21
2.2.1.2. A. Citocinas	21
2.2.1.2.A.1. Citocinas pro-inflamatorias	22
• TNF- α	22
• Interleucina 1 β	23
• Interleucina 6	23
• Factor de activación plaquetaria (PAF)	24
2.2.1.2.A.2. Citocinas anti-inflamatorias	25
• Interleucina 10	25
• Interleucina 4	25
2.2.1.2.B. Quimiocinas	25
2.2.1.2.C. Moléculas de adhesión	27
2.3. Modulación de la Respuesta Inflamatoria	29
2.3.1. N-Acetilcisteína (NAC)	29
2.3.2. Glucocorticoides (GC)	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Animales de experimentación	35
3.2. Grupos experimentales	35

3.2.1. Modelos <i>in vivo</i>	35
3.2.1.1. Pancreatitis agudas experimentales	35
3.2.1.2. Tratamientos	36
3.2.2. Estudios <i>in vitro</i>	40
3.2.2.1. Células acinares estimuladas con PAAF	40
3.2.2.2. Tratamientos	40
3.3. Parámetros de diagnóstico de la severidad	
de la pancreatitis aguda	42
3.3.1. Actividad amilasa en plasma	42
3.3.2. Porcentaje de fluido pancreático	43
3.3.3. Hematocrito	43
3.3.4. Valoración del estrés oxidativo en homogenados	
de páncreas: análisis de glutatión	43
3.3.5. Valoración de la infiltración en páncreas y pulmón.....	44
3.3.6. Actividad LDH en páncreas e hígado	45
3.3.7. Análisis histológico del páncreas por microscopía óptica	46
3.3.8. Valoración de la distribución	
de las poblaciones leucocitarias	48
3.4. Mediadores inflamatorios	48
3.4.1. Pulmón, páncreas y célula acinar	48
A. Recogida de tejido pulmonar y pancreático	48
B. Aislamiento de acinos y células acinares	49
3.4.1.1. Expresión de ARN mensajero para factores inflamatorios	52
3.4.1.1.A. Extracción del ARN total	52
3.4.1.1.B. RT-PCR semicuantitativa	52
3.4.1.2. Expresión de ICAM-1 en la membrana de células acinares	55
3.4.2. Valoración de mediadores inflamatorios	
en leucocitos circulantes	56
3.4.2.1. TNF- α y MCP-1	56
3.4.2.2. ICAM-1	59
3.4.3. Valoración de mediadores inflamatorios en plasma	61

3.5. Rutas de señalización de la respuesta	
inflamatoria en células acinares	
3.5.1. Obtención de extractos celulares	62
3.5.1.1. Extractos Nucleares	62
3.5.1.2. Extractos Citoplasmáticos	63
3.5.2. Análisis de MAPKs	65
3.5.3. Análisis de factores de transcripción	67
3.5.3.1. NF- κ B.....	67
3.5.3.1.A. Análisis de la proteína I κ B α	67
3.5.3.1.B. Unión NF- κ B/ADN	67
3.5.3.2. STAT3	67
3.6. Análisis estadístico	68
4. RESULTADOS	69
Estudios <i>in vivo</i>	73
4.1. Efecto de NAC sobre la expresión de quimiocinas	
en páncreas durante PA de distinta severidad	73
4.2. Efecto de la Dx sobre la expresión de quimiocinas	
en páncreas durante PA de distinta severidad	83
4.3. Efecto de NAC y Dx sobre la expresión de moléculas	
de adhesión en páncreas PA de distinta severidad	101
4.4. Efecto de NAC y Dx sobre el daño tisular	
causado durante la PA de distinta severidad	129
4.5. Efecto de NAC y Dx sobre la Respuesta Inflamatoria	
en leucocitos circulantes PA de distinta severidad	139
4.6. Efecto de NAC y Dx sobre la expresión de quimiocinas y moléculas	
de adhesión en pulmón durante PA de distinta severidad	161
TABLAS RESUMEN	165
Estudios <i>in vitro</i>	169
4.7. Estudios <i>in vitro</i> de la respuesta inflamatoria de la	
célula acinar bajo estimulación con PAAF	169
5. DISCUSIÓN	181
6. CONCLUSIONES	193
7. BIBLIOGRAFÍA	197

1. Objetivos

Sobre la base de la información bibliográfica existente en relación con nuestro tema de estudio, nos hemos planteado como objetivo general:

Estudiar en pancreatitis aguda edematosa y necrotizante los efectos de un tratamiento antioxidante (N-Acetilcisteína), y otro anti-inflamatorio (Dexametasona), sobre la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en diferentes niveles biológicos (célula acinar, tejido pancreático, plasma, leucocitos circulantes y pulmón) y relacionar los resultados con la efectividad de dichos tratamientos en la evolución de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Estudio *in vivo* del efecto de N-Acetilcisteína (NAC) sobre la expresión de quimiocinas en páncreas durante PA de distinta severidad.
2. Estudio *in vivo* del efecto de la Dexametasona (Dx) sobre la expresión de quimiocinas en páncreas durante PA de distinta severidad.
3. Estudio *in vivo* del efecto de NAC y Dx sobre la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) en páncreas durante PA de distinta severidad.
4. Estudio *in vivo* del efecto de NAC y Dx sobre el daño tisular causado durante PA de distinta severidad.
5. Estudio *in vivo* del efecto de NAC y Dx sobre la respuesta inflamatoria de los leucocitos circulantes durante PA de distinta severidad.
6. Estudio *in vivo* del efecto de la NAC y Dx sobre la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en pulmón durante PA de distinta severidad.
7. Estudio *in vitro* de la acción de NAC y Dx sobre la respuesta inflamatoria acinar bajo estimulación con PAAF (fluido ascítico asociado a pancreatitis).

2. Introducción

La Pancreatitis Aguda (PA) es una enfermedad inflamatoria del páncreas, en cuya fase inicial tienen lugar una serie de alteraciones intracelulares causantes de daño en la célula acinar y que evoluciona de forma rápida a una inflamación local que afecta en los primeros estadios de la enfermedad solamente al páncreas y tejido peripancreático.

Durante este proceso, mediadores inflamatorios son liberados desde distintas fuentes celulares desencadenando una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que afecta a órganos distantes del páncreas (McFadden, 1991; Makhija y Kingsnorth, 2002). Esta reacción pro-inflamatoria, frecuentemente es seguida por el desarrollo de CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) (Adib-Conquy y Cavaillon, 2009), que aparece para regular dicha respuesta inflamatoria. El concepto de CARS, fue propuesto por Roger Bone en 1997 (Bone y cols., 1997), y se caracteriza por una excesiva liberación de citocinas antiinflamatorias (Hirota y cols., 2000), que llevará al desarrollo de una severa inmunosupresión, aumentando la susceptibilidad a las infecciones (Hirota y cols., 2000; Takahashi y cols., 2006). En los casos más severos de SIRS y CARS, se produce el desarrollo del síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS) (Davies y Hagen, 1997; Al Mofleh, 2008), principal causa de muerte en pacientes con PA (Granger y Remick, 2005; Al Mofleh, 2008). Estudios en distintos modelos experimentales de PA han mostrado daño en distintos órganos; presentándose la primera manifestación de MODS en pulmón (Bhatia y cols., 2000a; Yubero y cols., 2009b), y después en hígado (Closa y cols., 1996a; Norman y cols., 1997) y en riñón (Gupta, 1971; Gordon y Calne, 1972). Elevados niveles de IL-6, IL-8 y TNF- α se ha visto relacionada con MODS en pacientes con PA (Hirota y cols., 2000; de la Torre-Prados y cols., 2001), quines mostraron también fallo respiratorio, hepático, renal y cardíaco (McFadden, 1991).

La PA es una enfermedad cuya incidencia ha aumentado en los últimos años de un 33 a un 44 por 100.000 adultos (Frey y cols., 2006), con más de 200.000 admisiones en el hospital cada año, tanto en USA (DeFrances y Hall, 2007) como en países europeos (Yadav y Lowenfels, 2006). Un 80% de estos pacientes desarrollaron una PA media que se resuelve sin serias complicaciones, mientras que el otro 20% presentó un PA grave, que en muchos casos termina con la muerte (Lund y cols., 2006).

La PA se ha asociado a diferentes etiologías, siendo los trastornos del tracto biliar debida a procesos obstructivos como la colestasis, anomalías anatómicas o carcinomas, la causa más frecuente de PA seguida del abuso de alcohol (Steer, 1995;

Pandol y cols., 2007). Ambas etiologías provocan el 80% de los casos de PA. Otros factores etiológicos de menor incidencia son determinados fármacos (Lankisch y cols., 1995), traumas en la glándula (Northrup y Simons, 1972), anomalías lipídicas (Toskes, 1990), hipercalcemia (Mithofer y cols., 1995), infecciones (Steinberg y Tenner, 1994) o enfermedades hereditarias (Whitcomb, 1999). Un 10% son PA idiomáticas, en los que no es posible identificar ninguna etiología conocida que generalmente se asocia a la PA (Grendell, 1990).

El principal síntoma clínico de los pacientes con PA es un fuerte dolor abdominal, que suele ir acompañado de náuseas, vómitos, taquicardia, hipotensión y fiebre (Granger y Remick, 2005; Frossard y cols., 2008). En una diagnosis temprana de la enfermedad, se han considerado buenos marcadores inflamatorios las citocinas IL-1 β , IL-8 y TNF- α (Al Mofleh, 2008), cuyos niveles plasmáticos están elevados durante primeros estadios de la enfermedad. También son importantes marcadores la fosfolipasa 2 (PLA-2), péptido activador de tripsinógeno (TAP), procalcitonina (PTC), proteína C reactiva (CRP) y proteína sérica amiloide A (SAA), que junto con la valoración en plasma de las enzimas pancreáticas lipasa y amilasa, ayudan a determinar la severidad de la enfermedad (Frossard y cols., 2008).

En el simposio de Atlanta de 1992 (Bradley, 1993), se establecieron las primeras directrices para una clasificación clínica de la PA, y desde entonces ésta ha sido criticada y cuestionada por distintos autores según distintos criterios. La clasificación más reciente establece tres categorías de severidad de PA en base a criterios de morbilidad y mortalidad: PA severa, caracterizada por una elevada morbilidad y mortalidad; PA moderada, de alta morbilidad y sin mortalidad; y PA media, de baja morbilidad y sin mortalidad (de Madaria y cols., 2009).

Debido a que el estudio del desarrollo y evolución clínica de la PA tiene sus limitaciones, se han desarrollado distintos modelos experimentales en los que se intenta reproducir la enfermedad atendiendo tanto a la etiología como a la sintomatología. El objetivo es doble: estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y buscar terapias potenciales para una futura aplicación clínica. Los distintos modelos experimentales utilizados son:

- Administración de dosis supramáximas de ceruleína, análogo de la enzima colecistokinina (CCK), que produce una PA de tipo edematosa media en rata y severa en ratón (Rakonczay Jr y cols., 2003; Pandol y cols., 2007). Se considera un método

muy apropiado para inducir PA con daño pulmonar asociado (Bhatia y cols., 2000b; Song y cols., 2002).

- Administración de dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (CDE), causante de una PA hemorrágica y necrotizante (Frossard y cols., 2008).

- Administración de altas dosis de L-Arginina, que provoca PA de evolución grave con importantes alteraciones histológicas (Tani y cols., 1990; Bulbullen y cols., 2005).

- Cierre del asa duodenal, que provoca reflujo del jugo duodenal hacia el conducto pancreático causando estados de PA de distinta gravedad (Satake y cols., 1988).

- Inducción de alteraciones vasculares, que modifican el flujo vascular pancreático y producen isquemia local, causando una PA con necrosis focal (Sjövall y cols., 1988; Waldner, 1992).

- Obstrucción biliopancreática (OBP), modelo que simula la PA de origen biliar desarrollada en humanos por presencia de cálculos biliares en los conductos (de Dios y cols., 2002a; Takaoka y cols., 2002), produciendo una PA de severidad media.

- Infusión por inyección o por perfusión intraductal de sustancias tóxicas, como sales biliares [(TcNa) (Aho y cols., 1984; Shi y cols., 2006), o ácido glycodeoxicólico (GDOC) (Rosen y Tüchler, 1992)], etyl-alcohol (Unal y cols., 2005) o agentes pro-oxidantes (Sledziński y cols., 2000), causando PA de tipo necrotizante.

2.1. MECANISMOS PATOGÉNICOS.

En 1896, Chiari sugirió por primera vez la autodigestión del páncreas como una posible explicación para la PA (Chiari, 1896). Independientemente de cual sea la etiología causante de la PA, la enfermedad cursa con un proceso progresivo de digestión de la glándula por acción de las propias enzimas pancreáticas, principalmente proteasas, que se activan prematuramente dentro del páncreas.

Hoy en día, está ampliamente aceptado que los eventos más tempranos de la PA ocurren en el interior de la células acinares pancreáticas (Schoenberg y cols., 1991; Cosen-Binker y cols., 2003), donde además de la activación de zimógenos digestivos, están implicados distintos factores patogénicos, tales como la alteración de la homeostasis del calcio, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la sobreexpresión de factores inflamatorios.

Estos eventos, que ocurren en la fase de iniciación de la PA, producen importantes alteraciones morfológicas y funcionales en la célula acinar, y son responsables de amplificar los daños al entorno extra-acinar del propio páncreas y a otros órganos distantes, transformando esa respuesta inflamatoria inicialmente localizada en el páncreas en una respuesta sistémica generalizada (Makhija y Kingsnorth, 2002a).

2.1.1. ACTIVACIÓN PREMATURA DE ENZIMAS DIGESTIVAS.

La célula pancreática acinar se encarga de sintetizar numerosas enzimas digestivas, que en condiciones fisiológicas se encuentran de forma inactiva (proenzimas o zimógenos) y cuya activación está prevenida por factores tales como: estar empaquetadas en gránulos limitados por membrana y por tanto protegidas de potenciales activadores presentes en el citosol (Emanuelli y cols., 1989), estar almacenadas con proteínas inhibidoras de su activación espontánea (Lerch y Adler, 1994) y estar en un medio con pH ácido que no favorece la activación de enzimas digestivas (Colomb y Figarella, 1979).

En condiciones no patológicas, los gránulos de zimógenos migran hacia el polo apical de la célula acinar descargando su contenido al lumen y únicamente cuando los zimógenos alcanzan el intestino se activan. Sin embargo en la PA ocurre una activación prematura dentro del páncreas. Es ampliamente aceptado que en el curso más temprano de la enfermedad ocurre la activación intraacinar de tripsinógeno a tripsina. Esta activación está favorecida por el bloqueo secretor descrita en PA humana y experimental (Mitchell y cols., 1983; Saluja y cols., 1989), asociado a una serie de alteraciones estructurales de los componentes del citoesqueleto (Jungermann y cols., 1995) y de las proteínas de membrana que participan en la exocitosis, como así lo describe Gaisano en su hipótesis de las proteínas reguladoras SNARE (Gaisano, 2000). Distintas teorías intentan explicar que como consecuencia del bloqueo secretor ocurre activación prematura de zimógenos. La teoría de la colocalización (Frossard y Pastor, 2002; Van Acker y cols., 2006) describe la presencia de zimógenos digestivos y enzimas hidrolasas lisosomales dentro de una misma vesícula citoplasmática. La más importante enzima lisosomal es la catepsina B que activa tripsinógeno a tripsina (Halangk, 2000). Aunque diferentes estudios apoyan ésta teoría (Houfbauer y cols., 1998; Lüthen y cols., 1998), otros autores (Figarella y cols., 1988; Willemer y cols., 1990) concluyeron que la colocalización podría ser necesaria pero no suficiente para la activación de tripsinógeno, ya que puede ocurrir

también en condiciones fisiológicas. Otra teoría defiende la autoactivación del tripsinógeno a tripsina (Kay y Kassell, 1971) favorecida por un pH intravacuolar próximo a 5.

La tripsina es responsable de activar enzimas y sintetizar sustancias bioactivas implicadas en el fallo pancreático y sistémico característico de la PA. La tripsina inicia por tanto una cascada de activación de otros factores, tales como la quimiotripsina (Marshall, 1993), elastasa (Niederau y cols., 1995), fosfolipasa A₂ (Hietaranta, 1993), lipasa (Marshall, 1993), sistema kinina-kallicreína (Griesbacher, 2000), sistema complemento y factores de coagulación (Geokas y cols., 1985), que contribuyen al proceso de digestión del páncreas y a desajustes hemodinámicos en la glándula durante la PA.

2.1.2. ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO.

El calcio es un mensajero clave en el control normal de la secreción acinar. En condiciones fisiológicas la concentración de calcio en el citosol es menor que la del fluido extracelular y la de los sistemas intracelulares de almacenamiento de calcio como el Retículo Endoplasmático (RE) (Raraty y cols., 2005). Este gradiente de concentración es mantenido por la acción de bombas ATP-asas de Ca²⁺ y de Mg²⁺, que se encuentran en la membrana plasmática, son las llamadas bombas PMCA (da Silva y Guse, 2000), o en la membrana del RE, bombas SERCA (Kribben y cols., 1983; Kim y cols., 2002). El mantenimiento de estos bajos niveles de Ca²⁺ citosólico, determina que pequeños incrementos en diferentes regiones de la célula sean utilizados como vía de señalización.

En células acinares pancreáticas, dosis fisiológicas de CCK o acetilcolina Ach producen oscilaciones en espiga de Ca²⁺ libre citosólico, necesarias para el control de importantes funciones celulares como la exocitosis (Argent y cols., 1976). Sin embargo, durante la PA inducida por estimulación con dosis supramáximas de secretagogos (Ward y cols., 1996) o por obstrucción biliopancreática (Uruñuela y cols., 2002a), se ha observado un aumento prolongado de calcio libre liberado desde RE y gránulos de zimógeno que provoca daño celular (Mithofer y cols., 1995) propio de la fisiopatología asociada a la PA. Ello se debe a alteraciones estructurales en las proteínas de membranas por mecanismos oxidativos durante la PA y/o un reducido aporte de ATP, que llevan a un deficiente funcionamiento de las bombas impulsoras de calcio (Pariente

y cols., 2001) encargadas de recuperar concentraciones homeostáticas de calcio citosólico.

El papel del calcio como mecanismo fisiopatológico de la PA se ha confirmado en distintos modelos experimentales (Uruñuela y cols., 2002a; Smith y cols., 2005), en los que se ha relacionado el aumento de Ca^{2+} libre citosólico en las células acinares con una activación prematura de zimógenos. Esta afirmación es reforzada por resultados obtenidos en estudios *in vitro*, sobre acinos pancreáticos expuestos a altas dosis de ceruleína (Saluja y cols., 1999; Krüger y cols., 2000). Por otra parte, el uso de agentes bloqueantes de canales de calcio (Closa y cols., 1996b; Hughes y cols., 1996a), han demostrado efectos beneficiosos sobre la PA, disminuyendo el daño pancreático asociado.

2.1.3. COLECISTOQUININA (CCK).

Esta hormona estimula la proliferación de células acinares pancreáticas (Logsdon, 1986), y potencia la síntesis y secreción de proteínas y enzimas digestivas (Korc y cols., 1981). Para ello, la CCK se une a receptores de la membrana de las células acinares, de tipo CCK-A, los cuales tiene dos sitios de unión para la hormona: uno de alta afinidad, ocupado cuando la concentración de la hormona es baja, y otro de baja afinidad ocupado cuando la CCK alcanza elevados niveles, relacionándose esto con el bloqueo secretor (Sankaran y cols., 1982). Este bloqueo se simula en modelos experimentales de PA inducidos con dosis supramáximas de CCK o su análogo ceruleína (Saluja y cols., 1989).

Ya que la secreción de esta hormona está regulada negativamente por la cantidad de tripsina en duodeno, los niveles de CCK se verán aumentados en cualquier proceso de PA como consecuencia del bloqueo en la secreción de enzimas digestivas. Altas concentraciones de CCK circulantes ocuparán receptores de baja afinidad, retroalimentando el bloqueo secretor de la célula acinar. Bajo la consideración de que la CCK puede actuar como factor patogénico de la PA, se han estudiado los distintos subtipos de receptores para CCK (Griesbacher y cols., 2005) y se ha buscado antagonistas óptimos de esos receptores con el fin de conseguir efectos beneficiosos para el tratamiento de la PA (Barrett y cols., 2008), las cuales se han descrito en modelos experimentales de pancreatitis inducida por dosis supramáximas de ceruleína (Murayama y cols., 1990; Garcia-Montero y cols., 1994), o por obstrucción del tracto

biliar (Niederau y cols., 1996, Barrett y cols., 2008). Sin embargo también se han descrito efectos perjudiciales en PA inducida por OBP en la rata (de Dios y cols., 2002b).

2.1.4. AUMENTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).

En condiciones normales y en condiciones patológicas se generan pequeñas cantidades de ROS que actúan como señales para activar la proliferación y supervivencia celular.

Son generados por células aeróbicas como productos de reacciones xenobióticas, siendo eliminados rápidamente en situaciones fisiológicas por sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos presentes en la célula. Entre los primeros, destaca la vitamina E, la vitamina C, β -caroteno y el tripéptido glutatión (GSH) (Halliwell, 1991; Hammond y cols., 2001). Este último es uno de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo más importantes actuando junto con sistemas antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Guice y cols., 1986).

Si la producción de ROS excede a la acción de los sistemas antioxidantes celulares, se desarrolla estrés oxidativo que causa alteraciones bioquímicas y funcionales, en distintas estructuras celulares, tales como peroxidación de lípidos de membrana plasmática y orgánulos intracelulares (Nonaka, 1990; Schoenberg y cols., 1994; Schulz y cols., 1999), oxidación de proteínas enzimáticas y estructurales (Reinheckel y cols., 1999) y daño oxidativo en el ADN (Wiseman y Halliwell, 1996).

Sanfey y cols. propusieron por primera vez en 1984 la implicación de ROS en el desarrollo de la PA (Sanfey y cols., 1984), y desde entonces numerosos estudios lo verifican. Análisis clínicos en pacientes (Park y cols., 2003; Wereszczynska-Siemiatkowska, 2003) y estudios en modelos experimentales de PA inducida por ceruleína (Closa y cols., 1994; Schoenberg y cols., 1994), por infusión de taurocolato sódico (Folch y cols., 1999; Rau y cols., 2000; Li y cols., 2006; Pereda y cols., 2006), o por OBP (Uruñuela y cols., 2002b; Sevillano y cols., 2003b), demuestran el importante papel que juegan los ROS en la fisiopatología de la PA.

En estudios experimentales, la valoración directa de ROS en células acinares (Uruñuela y cols., 2002b) o la valoración de parámetros de estrés oxidativo, como productos derivados de peroxidación lipídica (Schoenberg y cols., 1994), y proteica (Reinheckel y cols., 1999) en tejido pancreático, han demostrado que los ROS son

factores patogénicos muy tempranos en el curso de la PA. La brevedad de estos cambios oxidativos, antes incluso que las alteraciones morfológicas e hiperamilasemia, es un obstáculo difícil de sortear a la hora de plantear tratamientos antioxidantes que frenen la progresión de la enfermedad. Además, los ROS actúan como segundos mensajeros en la activación de vías de señalización implicadas en la expresión de citocinas, quimocinas y moléculas de adhesión (Zaninovic y cols., 2000; Pereda y cols., 2006; Chipitsyna y cols., 2007; Yubero y cols., 2009c) en los que intervienen MAPKs y factores de transcripción AP-1, NFκB y STATs. Además, por sí mismos, los ROS actúan como potentes quimioatrayentes de células inflamatorias circulantes (Poch y cols., 1999), las cuales a su vez contribuyen a incrementar la producción de más ROS en el tejido donde se han reclutado, retroalimentando el proceso oxidativo.

Tratamientos antioxidantes sugieren efectos beneficiosos en la patología de la PA. Administración de enzimas antioxidantes como la SOD o CAT han demostrado reducir la gravedad de PA experimental (Schulz y cols., 1999; Koiwai y cols., 1989) así como el uso de DMSO o de sustancias quelantes de iones metálicos (Niederau y cols., 1992; Schulz y cols., 1999). Además, sustancias precursoras de la síntesis de GSH (Lüthen y cols., 1995; Sevillano y cols., 2003a,b) han demostrado ser capaces de reducir las alteraciones histológicas, la infiltración y el daño oxidativo desarrollado durante la PA.

2.2. RESPUESTA INFLAMATORIA.

Como respuesta a la acción ejercida por los distintos factores patogénicos de la PA, se desarrolla una respuesta inflamatoria, en la que se pueden distinguir en los casos más graves tres fases: una respuesta inflamatoria local del páncreas, una respuesta inflamatoria generalizada o sistémica y una última etapa de fallo multiorgánico severo.

La lesión inicial producida en el páncreas por enzimas digestivas y procesos oxidativos celulares, provoca una cascada de liberación de mediadores inflamatorios como respuesta fisiopatológica inicial de protección frente a un daño localizado. La pérdida de este control da lugar a una activación excesiva e incontrolada de las células inflamatorias que extienden su respuesta a órganos extrapancreáticos.

2.2.1. RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL.

Son varias las fuentes celulares que desde el páncreas liberan mediadores inflamatorios en estadios iniciales de la PA; células del endotelio vascular (Lee y cols., 2003; Mordelet y cols., 2007), células estrelladas (Masamune y cols., 2006; Michalski y cols., 2007), leucocitos (de Dios y cols., 2002a; Mordelet y cols., 2007; Sun y Bhatia, 2007; Yubero y cols., 2009b) y las propias células acinares (Gukovskaya y cols., 1997; Blinman y cols., 2000; Ramudo y cols., 2005b; Ramnath, 2006, 2007 y 2008; Yubero 2009a,c) han demostrado ser capaces de producir distintos tipos de factores inflamatorios.

2.2.1.1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES INFLAMATORIOS.

2.2.1.1.A. MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases)

Las MAPKs pertenecen a la familia de las proteínas serina/treonina kinasas, activadas en respuesta a distintas señales tales como estrés oxidativo, citocinas, factores de crecimiento y hormonas (Dabrowski y cols., 1997; Kyriakis y Avruch, 2001), que son cruciales en el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

Hay cinco clases de MAPKs; p38-MAPK, ERK1/2 (extracellular-regulated kinase), JNK/SAPK (Jun N-terminal Kinase o stress-activated proteína kinase), ERK 3/4 y ERK 5 (Schäfer y Williams, 2000; McCubrey y cols., 2006). Su regulación depende de la fosforilación de un motivo conservado T-X-Y (Thr-X-Tyr) por medio de MKKs, también llamadas MEKs, las cuales a su vez son activadas por MKKKs o MEKKs.

El último paso en la cascada de fosforilaciones mediadas por estas kinasas, es la fosforilación de proteínas involucradas en procesos celulares, como la organización del citoesqueleto, modulación de la transcripción, síntesis de proteínas o procesos de crecimiento y diferenciación celular (Ferrell Jr, 1996; Kyriakis y Avruch, 1996; McCubrey y cols., 2006).

La activación de MAPKs puede ser contrarrestada por desfosforilación a través de actividad fosfatasa. Se han descrito dos grupos de fosfatasas atendiendo a los residuos que son capaces de defosforilar: las serina/treonina fosfatasas (PPPs) (Schmidt y cols., 1994)(Wang y cols., 2008), involucradas en procesos de control del ciclo celular y apoptosis, y las tirosinas fosfatasas (PTPs) (Burke Jr y Zhang, 1998; Tabernero y

cols., 2008), involucradas en mecanismos de señalización celular y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Este último grupo incluye a las fosfatasa de especificidad dual (DSPs), capaces de fosforilar residuos de treonina además de los de tirosina (Camps y cols., 2000). Se caracterizan por regular negativamente la vía de las MAPKs por lo que también son llamadas MKPs (MAPK fosfatasa). Recientes estudios demuestran el importante papel que las fosfatasa juegan durante la PA (Escobar y cols., 2009a, Sandoval y cols., 2009), cuya actividad y expresión se ha visto reducida en PA experimental inducida por ceruleína (Höfken y cols. 2000), por obstrucción biliopancreática (de Dios y cols., 2006) o por infusión retrógrada de TcNa (Escobar y cols., 2009b).

Los ROS han demostrado ser importantes factores de activación de MAPKs en distintos tipos celulares, como células vasculares musculares (Blanc y cols., 2003), hepatocitos (Conde de la Rosa y cols., 2006), neutrófilos ([Fialkow](#) y cols., 1994), células endoteliales ([Usatyuk](#) y cols., 2003) y células acinares ([Dabrowski](#) y cols., 2000 y 2003; Ramudo y cols., 2005b, 2009; Yubero y cols., 2009c).

Existen numerosas evidencias de la implicación de MAPKs en la fisiopatología de la PA. Estudios *in vitro*, mostraron activación de MAPKs en acinos pancreáticos de rata en respuesta a CCK (Dabrowski y cols., 1996; [Schäfer](#) y cols., 1998; Wagner y cols., 1999). Asimismo, estudios *in vivo*, indicaron activación de p38MAPK, JNK y ERK1/2 en páncreas en estadios tempranos de la PA inducida por infusión supramáxima de ceruleína (Grady y cols., 1996; [Fleischer](#) y cols., 2001), obstrucción biliopancreática (Ramudo y cols., 2005b; Yubero y cols., 2009a,c) o por infusión de taurocolato sódico (Pereda y cols., 2004; Sandoval y cols., 2009; Yubero y cols., 2009a,c).

MAPKs actúan como “up-streams” en la activación de factores de transcripción involucrados en la expresión de factores inflamatorios. Estimulación *in vitro* de células acinares con PAAF, mostró expresión de MCP-1 mediado por NF- κ B y MAPKs (Ramudo y cols., 2009). En modelos experimentales de PA, se observó expresión de citocinas mediada por activación de NF- κ B y MAPKs en monocitos (Liu y cols., 2003), neutrófilos (Poch y cols., 1999), células de Kupfer (Murr y cols., 2003), células estrelladas pancreáticas (Masamune y cols., 2002) y células acinares pancreáticas (Ramudo y cols., 2005b). El uso de inhibidores específicos de MAPKs en modelos experimentales de PA, han resultado asimismo eficaces para reducir la producción de

mediadores inflamatorios (Yang y cols., 1999; Wagner y cols., 2000; [Fleischer](#) y cols., 2001), lo que evidencia la contribución de estas proteínas en la cascada inflamatoria durante la PA.

2.2.1.1.B. FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B).

NF- κ B es un factor de transcripción clave, que determina el desarrollo de la respuesta inmune regulando la expresión de genes para la síntesis de quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y enzimas (Baeuerle y Henkle, 1994; Ghosh y cols., 1998, Hayden y Ghosh, 2004).

La forma activa de NF- κ B es un complejo dimérico constituido por proteínas miembros de la familia Rel, que se combinan formando homo y heterodímeros. Todas ellas se caracterizan por tener un dominio de homología Rel (RHD) formado por 300 aminoácidos en el extremo aminoterminal (Ghosh y cols., 1998). Este dominio RHD, determina la unión del ADN a elementos κ B, y controla la dimerización e interacción con proteínas inhibitoras de la familia I κ B (Siebenlist y cols., 1994; Ghosh y cols., 1998).

Hay cinco clases de proteínas Rel en mamíferos; RelA (p65), RelB, Rel (c-Rel), p50/p105 (NF- κ B1), y p52/p100 (NF- κ B2) (Ghosh y cols., 1998). Las proteínas RelB, c-Rel y p65, tienen un dominio transactivador (TAD) en el extremo carboxilo que permite reclutar coactivadores y desplazar represores (Chen y Greene, 2004). En cambio, los homodímeros p50 y p52 no tienen este dominio TAD y por tanto no son capaces de transcribir genes.

En condiciones normales, NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma de la célula unido a una proteína inhibidora de la familia I κ B (Gukovsky y cols., 1998; Hayden y Ghosh, 2004).

Independientemente de cual sea el estímulo, el primer paso en la vía de señalización es la fosforilación de I κ B, siendo así reconocida por la maquinaria de ubiquitinación para ser posteriormente degradada en el proteosoma 26S (Alkalay y cols., 1995). Esto permite la liberación del resto del complejo NF- κ B para su posterior translocación al núcleo donde regulará la transcripción de genes (Siebenlist y cols., 1994; Hayden y Ghosh, 2004).

Las señales capaces de iniciar la cascada de activación de NF- κ B son muy variadas; productos bacterianos y virales, mitógenos, agentes químicos, radiaciones,

citocinas o estrés oxidativo (Baeuerle y Henkle, 1991), siendo estas dos últimas específicamente relevantes en la fisiopatología de la PA (Leung y Chan, 2009).

En distintos modelos experimentales de PA, se ha demostrado la activación de NF- κ B. Dosis supramáximas de ceruleína o CCK activaron dicho factor de transcripción en ratas y ratones, incrementando la expresión de mediadores inflamatorios en células acinares y células inflamatorias (Gukovskaya 1998; Hietaranta y cols., 2001; Liu y cols., 2003). La combinación de dosis altas de CCK y una dieta con etanol, mostró activación de NF- κ B en páncreas, y aumento en los niveles de expresión de ARNm de TNF- α , IL-6, MCP-1 (Pandol y cols., 1999). Los mismos resultados se observaron en PA inducida por perfusión retrógrada de TcNa (Long y cols., 2005; Yubero y cols., 2009a,c) y en modelos de PA inducida por OBP (Ramudo y cols., 2005b; Samuel y cols., 2006). Activación de NF- κ B se ha observado también en macrófagos de ratas con PA inducida (Liu y cols., 2003; Ma y cols., 2005) y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con PA (Satoh y cols., 2003).

Debido al importante papel que juega este factor de transcripción en estadios tempranos de la PA, se han ensayado numerosos inhibidores de la activación de NF- κ B como tratamientos de la enfermedad. Antioxidantes como NAC (Vaquero y cols., 2001; Ramudo y cols., 2005b; Shi y cols., 2005b) o PDTC (Pyrrolidine dithiocarbonato) (Long y cols., 2005; Shi y cols., 2005b), han demostrado reducir la activación de NF- κ B mediada por estrés oxidativo. Otros tratamientos incluyen agentes antiinflamatorios como el etilpiruvato (Yang y cols., 2004), glucocorticoides (Rakonczay Jr y cols., 2003; Yubero y cols., 2009a) o inhibidores proteosomales (Letoha y cols., 2005). En todos los casos se redujo la respuesta inflamatoria durante la PA, demostrando así la implicación de NF- κ B en el desarrollo de la misma.

2.2.1.1.C. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT).

Las proteínas STATs son una familia de proteínas reconocidas originalmente en estudios de respuesta celular a IFN γ (Schindler y cols., 1992). Según su propio nombre indica, se les atribuye dos funciones principales: actuar como señales de transducción en el citoplasma y como activadores de la transcripción en el núcleo.

Todos los miembros de esta familia se caracterizan por tener secuencias similares en bloques de unos 700 aminoácidos de extensión, con un único residuo de

tirosina en la región terminal, el cual se fosforila durante la activación permitiendo la unión al ADN específicamente en una secuencia determinada (Darnell Jr y cols., 1994).

En la actualidad se conocen 6 genes en mamíferos localizados en distintas posiciones en el mapa cromosómico que codifican para las 7 tipos de proteínas STATs conocidas: STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6 (Schindler y Darnell Jr, 1995). Éstas, tienen una distribución variable; STAT 1, 2, 3, están presentes en la mayoría de los tipos celulares, mientras que STAT 5 y 6 y particularmente STAT4 tienen una distribución más limitada (Wakao y cols., 1994).

Ensayos de unión a ADN, han llevado a la identificación de numerosos ligandos que activan proteínas STATs. STAT1 se activa por ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Wen y cols., 1995). STAT3 también se activa también por estos factores de crecimiento además de por citocinas, como por ejemplo IL-6 (Schindler y Darnell Jr, 1995; Chao y cols., 2006) o IL-10 ([Rogatsky](#) y [Ivashkiv](#), 2006). STAT4 se ha encontrado activada por IL-12, IL-23 (Kaplan y cols., 1996), STAT5 por prolactina e IL-3 (Wakao y cols., 1994) y STAT6 por IL-4 e IL-13 (Hou y cols., 1994).

Las STATs están presentes como proteínas latentes en el citoplasma de las células y su activación, según demuestran diversos estudios, está mediada por las proteínas JAKs (Janus kinasas) (Silvennoinen y cols., 1993), una familia de tirosinas kinasas implicadas en la señal de transducción de muchos miembros de la familia de las citocinas (Darnell Jr y cols., 1994).

La unión del ligando al receptor activa por transfosforilación las JAKs asociadas, y éstas, una vez activadas fosforilan tirosinas distales del receptor. Todo ello permite que las STATs sean reclutadas por el complejo de señalización del receptor, y así fosforiladas en una única y conservada tirosina C-terminal que les lleva a disociarse del receptor y a formar dímeros, bien sean homo o heterodímeros ([Rogatsky](#) y [Ivashkiv](#), y cols., 2006), que se traslocan al núcleo donde se unirán al ADN para regular la expresión de genes (Darnell Jr y cols., 1994).

La actividad transcripcional de las STATs se potencia por la fosforilación de un residuo conservado de serina C-terminal, el cual promueve interacciones con proteínas adicionales importantes en la transcripción mediada por STATs, como coactivadores transcripcionales o histonas acetil transferasas (HATs). Además, las STATs, mediante un proceso de tetramerización mediado por el extremo N-terminal, pueden interactuar con factores transcripcionales adicionales, como por ejemplo Sp1 o receptores de

glucocorticoides, constituyendo una fuente potencial para el desarrollo de terapias (Schindler y Darnell Jr, 1995; [Rogatsky y Ivashkiv](#)., 2006).

Las proteínas JAK/STAT actúan en efectos biológicos mediados por la angiotensina II (Marrero y cols., 1997), por el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (Marrero y cols., 1997; Choudhury y cols., 1998) o por el factor de crecimiento endotelial (Zhong, 1994). Activación de la vía JAK/STAT ha sido observada en respuesta a estímulos pro-oxidantes (Simon y cols., 1998; Carballo y cols., 1999).

Esta vía de señalización está involucrada en numerosos desórdenes y patologías, la PA entre ellas. Activación de JAK/STAT se ha descrito en PA inducida en rata por ceruleína (Yu y cols., 2006), por OBP y por infusión con taurocolato (Yubero y cols. 2009a,c). Por otra parte, estudios *in vitro* con células acinares pancreáticas demostraron aumento de expresión de determinadas STATs en respuesta a estimulación con CCK (Kerr y cols., 2003), LPS (Vona-Davis y cols., 2005) o citocinas como IL-6 (Kerr y cols., 2003) y TNF- α (Kerr y cols., 2003; Robinson y cols., 2006).

La actividad de las proteínas STATs está regulada por las proteínas SOCS (supressors of cytokine signalling) (Vona-Davis y cols., 2005), cuya síntesis está a su vez inducida por citocinas (Nicholson y cols., 2000; Turnley y Bartlett, 2000) y por las propias STATs (Kong y cols., 2002), estableciéndose así un par de retroalimentación negativa.

2.2.1.1.D. Activator Protein-1 (AP-1).

AP-1 es un factor de transcripción involucrado en la activación de genes asociados con funciones celulares tales como crecimiento, diferenciación, proliferación y estrés celular. Su estructura está formada por dímeros constituidos por proteínas Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD) y proteínas Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) (Angel y Karin, 1991).

Los miembros de la familia Jun, pueden formar homo o heterodímeros (Smeal y cols., 1989), sin embargo las proteínas de la familia Fos sólo forman heterodímeros estables (Halazonetis y cols., 1988). Estos dímeros se unen al ADN en un determinado sitio de unión controlando la expresión de genes (Angel y Karin, 1991).

La expresión de AP-1 es inducida por distintos estímulos tales como factores de crecimiento, neurotransmisores, luz ultravioleta, ROS y citocinas (Angel y Karin,

1991), y su actividad está regulada por fosforilación de c-Jun o c-Fos, a través de quinasas pertenecientes a la familia de MAPKs (Karin, 1996; Karin y cols., 1997). Dependiendo de qué regiones de estas proteínas sean fosforiladas aumentará o disminuirá su capacidad de unión al ADN (Tsurumi y cols., 1995).

La estimulación de la unión de AP-1 al ADN puede ser catalizada por una proteína nuclear presente en todas las células de mamíferos llamada Ref-1 (Redox factor 1) (Abate y cols., 1990). La actividad de esta proteína ha demostrado estar aumentada por tioredoxina, sugiriendo que el estado redox celular podría estar involucrado en la regulación de AP-1 (Abate y cols., 1990).

No obstante, el uso de antioxidantes ha dado lugar a resultados discrepantes, ya que algunos estudios demostraron que su uso disminuye la actividad de AP-1 (Janssen y cols., 1995; Masamune y cols., 2002), mientras que otros mostraron efectos opuestos (Meyer y cols., 1993; Schenk y cols., 1994).

Distintos estudios han demostrado la implicación de AP-1 en la fisiopatología de la PA, debido principalmente al efecto que el estado redox ejerce sobre este factor de transcripción. Activación de AP-1 se ha demostrado en PA inducida por infusión retrógrada de taurocolato (Vaquero y cols., 2001), así como en PA inducida por administración de altas dosis de ceruleína o por administración de etanol junto con CCK, donde el tratamiento con curcumina, potente inhibidor de AP-1, demostró ser eficaz para reducir la respuesta inflamatoria y la severidad de la PA (Gukovsky y cols., 2000 y 2003). Estimulación *in vitro* de células pancreáticas AR42J con lisofosfatidilcolina (lyso-PC), producto generado de la actividad de la PLA₂, produjo un aumento de la actividad de AP-1 que resultó en apoptosis (Ellis y cols., 1991).

2.2.1.2. MEDIADORES INFLAMATORIOS.

2.2.1.2. A. CITOCINAS.

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (16 a 25 KDa) producidas en distintos tipos celulares, principalmente células del sistema inmunológico que actúan como mediadores intercelulares regulando la respuesta inflamatoria. Se conocen más de 30 tipos de citocinas, cada una de ellas con distinta estructura y rango de actividad. Tienen diversos efectos sobre distintas células diana y muchas de ellas comparten los mismos efectos biológicos, pudiéndose cursar así en ausencia de alguna.

Las citocinas no suelen producirse de forma constitutiva, sino que es bajo la acción de distintos estímulos como estrés oxidativo, daño celular o estímulos externos, cuando se incrementa la síntesis de su ARNm. Éstas a su vez pueden inducir su propia síntesis y la de otras citocinas nuevas amplificando en cascada la señal inflamatoria (Norman, 1998).

Rinderknecht, fue el primero que propuso la participación de las citocinas en la PA en 1988 (Rinderknecht, 1988) y desde entonces numerosos estudios de PA clínica (Leser y cols., 1991; Norman, 1998; Berney y cols., 1999) y PA experimental (Norman y cols., 1995b; de Dios y cols., 2002a; Shi y cols., 2006) lo han confirmado. Todos ellos han mostrado niveles elevados de citocinas circulantes en plasma desde primeros estadios de la enfermedad, considerándose un parámetro predictivo del progreso y de la severidad de la PA.

Dada la importancia de las citocinas en la fisiopatología de la PA, numerosos estudios han analizado efectos de terapias anti-citocinas con el fin de modular su activación y bloquear sus efectos durante el inicio y progreso de la enfermedad (Grewal y cols., 1994, Hughes y cols., 1996; Denham y cols., 1997; Rau y cols., 2005).

2.2.1.2.A.1. CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.

• *Factor de necrosis tumoral α (TNF- α).*

Es una citocina de 17 KDa, que ejerce su actividad uniéndose a receptores de membrana pertenecientes a la familia de TNFR situados en la superficie de la célula diana (Aggarwal, 2003).

TNF- α es producido por distintos tipos celulares, principalmente monocitos y macrófagos activados (Norman, 1998), pero también en linfocitos T y células acinares (Norman, 1995a; Gukovskaya y cols., 1997; Ramudo y cols., 2005a,b,c). TNF- α se une a receptores llamados TNFR1 (55KDa) y TNFR2 (75KDa) (Colomb y Figarella, 1979), para llevar a cabo una función apoptótica (Vandenabeele, 1995) o una función proinflamatoria, induciendo la síntesis de otras citocinas como IL-6, IL-8, IL-10 o más TNF- α , por medio de activación de factores de transcripción (Norman, 1998). Además, es capaz de inducir la activación de neutrófilos favoreciendo su adhesión en sitios de inflamación (Ismail y cols., 1987).

Elevadas concentraciones de TNF- α en plasma, se han detectado en menos de 1 hora después de inducir la PA en modelos experimentales de distinta severidad (Norman, 1995a; de Dios y cols., 2002a; Ramudo y cols., 2005b), así como en

pacientes con PA pocas horas después de su ingreso en el hospital (de Beaux y cols., 1996; Nakae y cols., 2001).

TNF- α es producido en el páncreas en los primeros estadios de la PA y posteriormente la proteína se sobreexpresa en hígado, pulmón y bazo (Norman y cols., 1997), producción extrapancreática que contribuye en gran medida a aumentar los niveles sistémicos de esta citocina.

• *Interleucina 1 β (IL-1 β).*

Es también una potente citocina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos (Norman, 1998; Bhatia y cols., 2000a), la cual es capaz de activar neutrófilos e inducir la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales (Fink y Norman, 1997).

La producción de IL-1 β está acompañada por la producción de la enzima ICE (Interleukin-1 converting enzyme), responsable de la hidrólisis de la forma pro-IL-1 β (Fink y Norman, 1997) y de su receptor antagonista IL-1ra (Fisher Jr y cols., 1994), con papel protector incluso para órganos distales (Norman y cols., 1995b).

Infusiones combinadas de TNF- α e IL-1 β tienen efectos pro-inflamatorios sinérgicos. El uso de ratones knockout para receptores de TNF- α e IL-1 β demuestran la contribución en la severidad de la enfermedad de éstas dos citocinas (Denham y cols., 1997).

Elevados niveles de IL-1 β se han encontrado en pacientes con PA (Hirota y cols., 2000) y en modelos experimentales (Fink y Norman, 1997; Grewal, 1994; Tanaka y cols., 1995; Yubero y cols., 2009a) en estadios tempranos de la enfermedad.

• *Interleucina 6 (IL-6).*

IL-6 es una citocina producida por gran variedad de tipos celulares como monocitos/macrófagos, células endoteliales, linfocitos T o fibroblastos (Van Snick, 1990)(Hirano, 1992) en respuesta a estímulos proinflamatorios como endotoxinas, IL-1 β o TNF- α (Schölmerich, 1996)(Bhatia y cols., 2000a).

La síntesis de IL-6 es activada en las primeras fases de la PA (de Beaux y cols., 1996; Shi y cols., 2006; Yubero y cols., 2009b). Es la principal citocina mediadora de la síntesis de proteínas de fase aguda. Sus niveles están correlacionados con la actividad de la proteína C reactiva y la fosfolipasa A (Viedma y cols., 1992; Mayer y cols., 2000), por lo que la IL-6 se ha considerado un buen indicador de la severidad de la enfermedad

(Leser y cols., 1991; Pezilli y cols., 1998) prediciendo futuros fallos multiorgánicos (de Beaux y cols., 1996; Mayer y cols., 2000).

Niveles plasmáticos elevados de IL-6 se han detectado en pacientes con PA a las pocas horas de su ingreso en el hospital (de Beaux y cols., 1996; Berney y cols., 1999; Ohmoto y Yamamoto, 2005). También en distintos modelos experimentales la IL-6 aumentó al poco tiempo de haber inducido PA por infusión retrógrada de TcNa (Vaquero y cols., 2001; Shi y cols., 2006; Yubero y cols., 2009b), obstrucción biliopancreática (de Dios y cols., 2002; Márton y cols., 1997; Takaoka y cols., 2002) o administración de dosis supramáximas de ceruleína (Berney y cols., 1999; Rakonczay Jr y cols., 2003).

• ***Factor de activación plaquetaria (PAF).***

PAF (1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) es un fosfolípido de bajo peso molecular liberado por la acción de la PLA₂ (Emanuelli G y cols., 1989), que interactúa con receptores específicos en la superficie celular identificados en numerosas células, como plaquetas, leucocitos, células endoteliales, acinares y pulmonares (Emanuelli y cols., 1989; Schölmerich, 1996; Norman, 1998; Masamune y cols., 1999).

PAF induce activación y agregación plaquetaria, quimiotaxis, vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y activación de linfocitos, favoreciendo su adhesión a células endoteliales y su posterior infiltración (Johnson, 1999). También activa la expresión de moléculas de adhesión y citocinas mediada por p38MAPK, NF-κB y STATs (Denham y cols., 1997; Masamune y cols., 1999).

La implicación fisiopatológica de PAF en la PA fue demostrada por primera vez en 1989 (Emanuelli y cols., 1989), y desde entonces numerosos modelos experimentales lo confirman (Emanuelli y cols., 1989 y 1994; Zhou y cols., 1992).

PAF es inactivado por PAF-AH (platelet activating factor acetilhydrolase), y el uso de este producto mostró un efecto protector contra la PA y el daño pulmonar asociado (Hofbauer y cols., 1998). Pero sin duda la mejor terapia contra los efectos del PAF es el tratamiento con antagonistas específicos, los cuales reducen la inflamación local, la necrosis e incluso fallo multiorgánico y la muerte (Dabrowski y cols., 1991; Formela y cols., 1994; Lane y cols., 2001).

2.2.1.2.A.2. CITOCINAS ANTI-INFLAMATORIAS.

• *Interleucina 10 (IL-10).*

Es producida principalmente por leucocitos en respuesta a distintos estímulos como LPS, IL-1 β o TNF- α (de Dios y cols., 2002a; Hanada y Yoshimura 2002), aunque también se ha detectado en células acinares (Ramudo y cols., 2005c). Su función principal es inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias desde macrófagos y neutrófilos protegiendo así el tejido (Cassatella, 1998). IL-10 induce la síntesis de antagonistas de citocinas naturales como IL-1ra y receptores TNF- α (Moore y cols., 2001), ejerciendo de esta forma su acción anti-inflamatoria. Además, es capaz de inhibir la activación de kinasas de I κ B (IKK), y por tanto la degradación de I κ B α , impidiendo de esta forma la actividad del factor de transcripción NF- κ B.

Se considera una “anticitocina”, cuyos beneficios terapéuticos se han demostrado en distintos modelos experimentales de PA (Van Laethem y cols., 1995; Rongione y cols., 1997; Keceli y cols., 2005). Administración profiláctica de IL-10 en pacientes con PA severa también ha mostrado efectos beneficiosos reduciendo la severidad de la enfermedad (Devière y cols., 2001).

Elevados niveles de IL-10 en plasma se han observado en las primeras horas de ingreso en pacientes con PA, guardando una relación inversa con la gravedad de la enfermedad (Pezilli y cols., 1997; Berney y cols., 1999). Otros estudios interpretaron la severidad en función del ratio de IL-10/IL-6 que resultó menor en pacientes con PA severa, sugiriendo una predominante respuesta pro-inflamatoria (Ohmoto y Yamamoto, 2005).

• *Interleucina 4 (IL-4).*

Es una citocina producida por linfocitos Th2, con acción anti-inflamatoria directa, modulando la proliferación de células inflamatorias y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Su papel en la PA, como ocurre con la IL-10, es poco conocida, pero parece existir un descenso de los niveles de IL-4 durante la PA (Osman y cols., 1999).

2.2.1.2.B. QUIMIOCINAS.

Es una familia de proteínas de pequeño tamaño (8 a 10 KDa), encargadas de inducir quimiotaxis y activar y dirigir la migración de leucocitos a tejidos inflamados (Adams y Lloyd, 1997). Se dividen en 4 subfamilias: C, CC, CXC y CX₃C, en base a la posición de los residuos cisteína N-terminales que determina su actividad biológica. Las más conocidas son la familia CXC y CC. Las CXC tienen las dos primeras cisteínas

separadas en la molécula por otro aminoácido, y se caracterizan por ser quimioatrayentes y activadores de neutrófilos. La más conocida es la IL-8 cuyo homólogo en la rata es el CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) (Murphy, 1994). Otras propiedades atribuidas a la IL-8 incluyen la inducción rápida de la expresión de integrinas LFA-1 y de L-selectina. La subfamilia CC, en cambio, tiene las cisteínas adyacentes y actúan como quimioatrayentes y activadores principalmente de monocitos aunque también de linfocitos, eosinófilos y basófilos (Murphy, 1994; Adams y Lloyd, 1997). Pertenecen a este grupo MCP-1, (Monocyte chemoattractant protein-1) MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) y RANTES (Regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted) (Bhatia, 2005).

Las quimiocinas son producidas por un amplio rango de tipos celulares y tejidos: leucocitos, plaquetas, fibroblastos, células endoteliales y células acinares (Grady y cols., 1997; Bhatia y cols., 2000a, 2002; Ramnath y cols., 2007; Sun y Bhatia, 2007; Yubero y cols., 2009a,b,c; Ramudo y cols., 2010a). Su expresión es constitutiva o inducida por mediadores pro-inflamatorios como IL-1, IL-2, TNF- α , IFN γ , productos bacterianos o lipopolisacáridos (Baggiolini y cols., 1994).

Las quimocinas median sus acciones por vía específica con receptores transmembrana, miembros de la superfamilia rodopsina, la mayoría de ellos acopladas a proteínas G. Tras su unión con el ligando se produce un incremento de calcio intracelular y activación de la proteína kinasa C (PKC), la cual activa la cascada de MAPKs. Las quimiocinas pueden sufrir una acción hidrolítica por proteasas en su región N-terminal, alterando su interacción con el receptor y reduciendo así su actividad biológica (Proost y cols., 2006).

Una de las principales funciones de las quimiocinas es contribuir al reclutamiento de leucocitos, para lo cual primeramente activan integrinas expresadas en ellos que median la adhesión a células endoteliales y proteínas de la matriz, y en segundo lugar promueven la migración de dichos leucocitos a través del endotelio (Springer, 1995; Butcher y Picker, 1996). Además, las quimocinas son responsables de activar leucocitos incrementando la habilidad de los neutrófilos para matar bacterias (Biaggiolini y cols., 1994) o activando células T promoviendo su proliferación (Bacon y cols., 1995), siendo ésta una importante defensa contra la infección.

La expresión de quimiocinas se ha comprobado en modelos experimentales de PA de distinta severidad. PA edematosa inducida por administración de dosis supramáximas de ceruleína (Grady y cols., 1997; Brady y cols., 2002), por obstrucción

biliopancreática (Yubero y cols., 2009c) o PA necrotizante inducida por infusión retrógrada de TcNa, (Brady y cols., 2002; Shi y cols., 2006; Yubero y cols., 2009a,b), han demostrado sobreexpresión de CINC y MCP-1 en páncreas (Brady y cols., 2002; Yubero y cols., 2009a,c), células acinares (Grady y cols., 1997; Shi y cols., 2006, Yubero y cols., 2009a,c) y monocitos circulantes (Yubero y cols., 2009b, Ramudo y cols., 2010) además de un aumento de los niveles de estas quimocinas en el plasma (Yubero y cols., 2009a,c). Estudios clínicos de pacientes con PA han mostrado elevados niveles de IL-8 en sus primeros estadios, habiéndose sugerido como indicador de la severidad de la enfermedad (Rau y cols., 1997; Berney y cols., 1999).

Debido al papel de las quimocinas en la respuesta inflamatoria, diversos estudios las han considerado dianas terapéuticas en PA. Anticuerpos de alta afinidad contra ellas, como por ejemplo anticuerpos anti-IL-8 (Sekido y cols., 1993; Osman y cols., 1998) o anti-CINC (Bhatia y cols., 2000b), modificaciones del receptor que implique pérdida de actividad (Gerard y cols., 1997), antagonistas del receptor (Bhatia y cols., 2003) o administración de glucocorticoides (Ramudo y cols., 2009, 2010; Yubero y cols., 2009a,b) se han ensayado con el fin de reducir la severidad de la enfermedad.

2.2.1.2.C. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

Son moléculas involucradas en el proceso de infiltración de leucocitos a tejidos dañados durante el proceso inflamatorio, mediando interacciones entre los leucocitos y la célula endotelial. Hay tres familias de moléculas de adhesión: selectinas, integrinas e inmonoglobulinas.

• *Selectinas.*

Las selectinas juegan un papel crucial en la captura y “rolling” de leucocitos, un proceso que requiere una rápida asociación y disociación de selectinas y ligandos que determinan la velocidad y el tránsito leucocitario (von Andrian y cols., 1995).

La E-selectina se expresa en células endoteliales activadas por TNF- α o IL-1 β (Masamune y cols., 1995; Rahman y cols., 1998). Esta selectina es capaz de reconocer el ligando ESL-1 (ligando-1 E-selectina) expresado en la membrana de leucocitos para poder ser capturados posteriormente (Yan y cols., 1994). E-selectina se ha detectado en plasma de pacientes con PA (Wereszczynska-Siemiatkowska y cols., 2000; Nakae y cols., 2001) y en diferentes órganos de animales con PA experimentalmente inducida, tales como páncreas (Zhao y cols., 2003; Lau y Bhatia, 2007) y pulmón (Lau y Bhatia, 2007).

L-selectina se expresa en todos los leucocitos y su unión a ligandos permite la activación de neutrófilos, jugando un papel muy importante en la PA con daño pulmonar asociado (Zhao y cols., 2005).

P-selectina se expresa constitutivamente en plaquetas y de forma inducida en células endoteliales. Se almacena en α -gránulos de plaquetas y en cuerpos Weibel-Palade de la células endoteliales, migrando rápidamente a la superficie después de la activación de dichas células endoteliales (Walzog y Gaehtgens, 2000). Actúa sobre leucocitos activados durante el proceso inflamatorio uniéndose a ellos por el ligando PSGL-1 (Walzog y Gaehtgens, 2000), permitiendo así su adhesión al endotelio. P-selectina interviene en el reclutamiento y “rolling” de leucocitos en procesos daño pulmonar y vascular (Mulligan y cols., 1992) y en procesos inflamatorios como la PA. Aumento en la expresión de P-selectina se ha observado en modelos experimentales de distinta severidad (Folch y cols., 1999; Lau y Bhatia, 2007) y en plasma de pacientes con PA (Pezilli y cols., 2008).

• ***Integrinas.***

Las integrinas son moléculas que median la firme adhesión de leucocitos al endotelio vascular por unión a moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas expresadas en células endoteliales.

Son moléculas formadas por dos subunidades α y β , ésta última dividida en cuatro tipos: β_1 (CD29), β_2 (CD18), β_3 (CD18) y β_7 . Dentro de las integrinas β_2 hay cuatro subtipos designados acorde con la subunidad α : LFA1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/Cd18), gp150/95 (CD11c/CD18) y CD11d/CD18 (Walzog y Gaehtgens, 2000).

Las β_2 integrinas se sintetizan constitutivamente en leucocitos, donde la más importante es la LFA-1, que media la firme adhesión de leucocitos a células endoteliales por unión a moléculas de adhesión de tipo ICAM. Las β_1 integrinas en cambio, se encargan principalmente de mediar la extravasación de leucocitos por unión a VCAM-1 (Walzog y Gaehtgens, 2000).

• ***Inmunoglobulinas.***

Hay varios tipos: PECAM (CD31), VCAM (CD16), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50).

PECAM es expresada en plaquetas y leucocitos encargándose de la trans migración de éstos últimos (Muller y cols., 1993; Machelska y cols., 2004). VCAM

en cambio se expresa principalmente en células endoteliales (Masamune y cols., 1999) y es sobreexpresada bajo estimulación por mediadores inflamatorios especialmente citocinas (Walzog y Gaetgens, 2000; Nakae y cols., 2001).

ICAM-1 se une a integrinas LFA-1 y Mac-1 expresadas en leucocitos dependiendo de la presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} (Dustin y Springer, 1989; Diamond y Springer, 1993). Durante la PA, incrementos en los niveles de citocinas como TNF- α , IL-1 o IL-6 se han relacionado con la expresión de ICAM-1 (Li y cols., 2008).

En distintos modelos experimentales de PA media y severa, se ha observado un aumento en la expresión de ICAM-1 desde primeros estadios de la enfermedad en páncreas (Frossard y cols., 1999; Werner y cols., 1999; Lau y Bhatia, 2007), pulmón (Werner y cols., 1999; Lundberg y cols., 2001; Lau y Bhatia, 2007), células acinares (Zaninovic y cols., 2000; Ramudo y cols., 2007, 2010b), leucocitos (Albeada y cols., 1994; Yubero y cols., 2009b) y células endoteliales (Masamune y cols., 1999; Wung y cols., 2005). Además elevados niveles de ICAM-1 se han detectado en plasma en estudios experimentales (Frossard y cols., 1999; Zhao y cols., 2005; Ramudo y cols., 2007, 2010b) y en pacientes con PA (Nakae y cols., 2001; Pezilli y cols., 2008).

Distinta efectividad en la evolución de la PA ha resultado de diversos tratamientos enfocados al bloqueo de la acción de ICAM-1, usando anticuerpos específicos (Werner y cols., 1998 y 1999; Rau y cols., 2001; Lundberg y cols., 2001; Yokomura y cols., 2001), antagonistas del receptor neurokinina-1 (Lau y Bhatia, 2007) o antioxidantes (Virlos y cols., 2003).

2.3. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

2.3.1. N-ACETILCISTEÍNA (NAC).

La NAC es un derivado del aminoácido cisteína, con un grupo -SH en su molécula que le confiere una gran capacidad antioxidante, y un grupo acetilo que evita que sea rápidamente oxidada a cisteína. De este modo NAC puede llegar a los tejidos, donde sufre deacetilación para servir de precursor de la síntesis de GSH, compuesto básico en la defensa antioxidante celular (Cotgreave, 1997).

Además de su efecto mucolítico (Sheffner, 1963), NAC ha demostrado reducir la toxicidad de ROS en el pulmón disminuyendo el síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (ARDS) asociado a procesos inflamatorios agudos (Feddersen y cols., 1993).

NAC ha demostrado también amortiguar la producción de ROS en células acinares pancreáticas de ratas con PA, y así reducir el aumento de calcio citosólico que ocurre desde primeros estadios de la enfermedad (Uruñuela y cols., 2002; Sevillano y cols., 2003a). Acorde con esto, NAC previene la disrupción del citoesqueleto, alteración asociada con el aumento de calcio citosólico y relacionado con el bloqueo secretor de enzimas, disminuyendo el acúmulo de enzimas digestivas (de Dios y cols., 2002b; de la Mano, cols., 2002). Todo ello permite prevenir los mecanismos patológicos ocurridos durante la PA aminorando así la severidad de la enfermedad.

NAC es capaz de inhibir las vías de señalización dependientes del estado redox e implicadas en la síntesis de mediadores inflamatorios, interfiriendo en la fosforilación de MAPKs (Ramudo y cols., 2005b), así como en la activación de los factores de transcripción NF- κ B (Ramudo y cols., 2005; Yubero y cols., 2009c). De esta forma, la administración de NAC es capaz de disminuir los niveles de citocinas y quimiocinas, un efecto observado en estudios realizados *in vivo* (Kim y cols., 2000; Ramudo y cols., 2005b,c; Yubero y cols., 2009c) e *in vitro* (Li y Karin, 1999; Yu y cols., 2002; Ramudo y cols., 2009).

Además, NAC ha demostrado aumentar la capacidad de las células acinares para producir IL-10 en estadios tempranos de la PA (Ramudo L y cols., 2005c) e incrementar el ratio IL-10/IL-6 en plasma (Shi C y cols., 2005a).

Gracias a todo ello, NAC ha demostrado tener un importante papel protector en distintos modelos de PA, tal como lo demuestran análisis llevados a cabo en páncreas y en órganos extrapancreáticos como pulmón e hígado (Demols y cols., 2000; Gukovsky y cols., 2000; Sevillano y cols., 2003).

2.3.2. GLUCOCORTICOIDES (GC).

Los efectos beneficiosos de los GC como antiinflamatorios fueron descritos por primera vez en 1950 en pacientes con asma (Carrier y cols., 1950), y desde entonces han sido elegidos como tratamiento en diferentes enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, asma o PA (Stephenson y cols., 1952; Rogatsky y Ivashkiv, 2006; Zhang y cols., 2007a,b; Yubero 2009a,b).

El GC entra por difusión pasiva a través de la membrana celular y en el citoplasma se une al receptor de glucocorticoide (GR), el cual se dimeriza y se trasloca al núcleo, donde se unen a elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE) del DNA. Allí regulará la transcripción de genes por distintas vías: unión del complejo GC-GR a

secuencias específicas del ADN, o modulación de la estabilidad de moléculas de ARNm (Strähle y cols., 1988; Beato, 1989; Didonato y cols., 1996).

GC actúan como anti-inflamatorios por interferir en la actividad de factores de transcripción como AP-1 (Adcock y cols., 1994; Didonato y cols., 1996; Barnes, 1998), NF- κ B (Ray y Prefontaine, 1994) o STATs (Zhang y cols., 1997; Rogatsky y Ivashkiv, 2006).

GR activado puede interactuar con factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B y ejercer un efecto de transrepresión por una interacción directa proteína-proteína, inhibiendo de esta manera la expresión de un amplio rango de genes inflamatorios. Se ha descrito la inhibición de la expresión de los genes activados por NF- κ B, por una directa interacción del complejo GC-GR y la subunidad p65 (Ray y Prefontaine, 1994; Caldenhoven y cols., 1995). Otro mecanismo puede ser la transactivación, activando en este caso, la síntesis de proteína I κ B α encargada de mantener secuestrado al complejo NF- κ B en el citoplasma (Auphan y cols., 1995; Scheinman y cols., 1995; Didonato y cols., 1996).

Hay cada vez más evidencias que afirman que los GC están implicados en una regulación epigenética de la respuesta inflamatoria, ya que son capaces de producir cambios en la estructura de la cromatina, aumentando o disminuyendo así la transcripción de genes. Los GR pueden unirse a coactivadores, los cuales tienen una intrínseca actividad acetiltransferasa que provoca acetilación de residuos de histonas e incrementa la transcripción. De igual forma estos receptores pueden unirse a moléculas co-represoras, deacetilando histonas y previniendo la unión a factores de transcripción, reprimiendo así la expresión del gen (Wolffe, 1997).

Los GC pueden controlar la inflamación incrementando la transcripción de genes anti-inflamatorios o reduciendo la expresión de genes pro-inflamatorios (Barnes y Adcock, 1993; Barnes, 1997). Tratamientos con distintos tipos de GC como metilprednisolona, hidrocortisona o dexametasona en estudios experimentales y clínicos de PA, han demostrado reducir los niveles séricos de citocinas como IL-1, TNF- α o IL-6 (Takaoka y cols., 2002; Paszt y cols., 2004; Zhang y cols., 2007a) y de quimiocinas como IL-8, CINC y MCP-1 (Abe y cols., 1995; Yubero y cols., 2009a; Ramudo y cols., 2010a). Los GC también han demostrado ser capaces de regular la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y selectinas (van de Stolpe y cols., 1993; Takahira y cols., 2001), atenuando la infiltración. La reducción de estos mediadores inflamatorios confiere a los GC la capacidad de reducir la severidad de la

PA, disminuyendo daño celular, mejorando desórdenes microcirculatorios y reduciendo alteraciones histológicas como hemorragia, edema y necrosis (Abe y cols., 1995; Zhang y cols., 2007b).

3. Materiales y Métodos

3.1. ANIMALES de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la raza Wistar con un peso comprendido entre 250 y 300 g, alimentadas con pienso comercial estándar para animales de laboratorio (Panlab® S.L.) y con acceso libre a agua. Los animales fueron suministrados y mantenidos por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, cumpliendo con la normativa impuesta por el Consejo de la Comunidad Europea en relación con la protección de animales utilizados para experimentación y con otros fines científicos (86/609/CEE). Se mantuvieron en jaulas ubicadas en habitaciones termostatzadas a una temperatura de 20-23°C y alternancia de períodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTALES.

3.2.1. MODELOS *IN VIVO*.

3.2.1.1. Pancreatitis agudas experimentales (Esquema 1).

Tras un ayuno de 12 h con acceso libre a agua, los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (Forane®, Abbott) y se colocaron en posición “decúbito supino”. Se practicó una laparotomía ventral para acceder a la cavidad peritoneal y aislar el colédoco. La PA se indujo por dos métodos distintos:

- OBSTRUCCIÓN BILIOPANCREÁTICA (OBP).

Una vez aislado el colédoco, se practicó una ligadura en su extremo más distal, próximo a la desembocadura de dicho conducto en el duodeno. Dentro de este grupo se establecieron dos subgrupos experimentales, en función del tiempo transcurrido entre la obstrucción del colédoco y la recogida de las muestras:

- - OBP 3 h
- - OBP 12 h

- • INFUSIÓN RETRÓGRADA DE TAUCOLATO SÓDICO (TcNa).

Esta PA se indujo según el método descrito por Aho y Nevalainen (Aho y Nevalainen, 1980). En primer lugar, se cerró momentáneamente el conducto hepático con una pinza bulldog y se practicó una ligadura en la parte distal del colédoco. A continuación, se hizo una pequeña incisión en dicho conducto para introducir una cánula de 0,6 mm de diámetro (Braun), a través de la cual se realizó la perfusión retrógrada en el conducto pancreático de TcNa al 3,5% (0.1ml/100 g de peso) con ayuda de una bomba peristáltica programada para flujo constante de 0.03 ml/min. Finalmente, se retiró la cánula y la pinza bulldog.

Dentro de este grupo se establecieron también dos subgrupos experimentales, en función del tiempo transcurrido entre la infusión de TcNa y la recogida de las muestras:

- TcNa 3 h
- TcNa 6 h

En ambos modelos, una vez inducida la PA y suturada la herida con seda 3/0, se desinfectó la zona manipulada quirúrgicamente con Veterín-Tenicol (Intervet S.A.). Los animales se devolvieron a sus jaulas donde recuperaron la consciencia de forma casi inmediata. Durante el postoperatorio, todos los animales recibieron buprenorfina (0,2 mg/kg/8 h) por vía intramuscular como analgésico.

3.2.1.2. Tratamientos.

• ANTIOXIDANTE.

N-Acetilcisteína (NAC), disuelta en agua estéril a una concentración de 300 mM, se administró intraperitonealmente 1 h antes de inducir la PA y 1 h después de la misma, a una dosis de 50 mg/kg peso corporal por cada inyección. Dicho tratamiento se aplicó en las dos PA, y los grupos resultantes fueron:

- | | |
|----------------|----------------|
| - OBP 3 h NAC | - TcNa 3 h NAC |
| - OBP 12 h NAC | - TcNa 6 h NAC |

• ANTI-INFLAMATORIO.

La dexametasona (Dx), disuelta en solución salina, se administró por inyección intramuscular a una dosis de 1 mg/kg peso corporal. Se establecieron a su vez dos subgrupos según si el tratamiento fuera profiláctico o terapéutico, administrándose 30 minutos antes o 1 hora después de inducir la PA, respectivamente. Estos tratamientos se aplicaron a animales sometidos a los dos tipos de PA. Los grupos resultantes fueron:

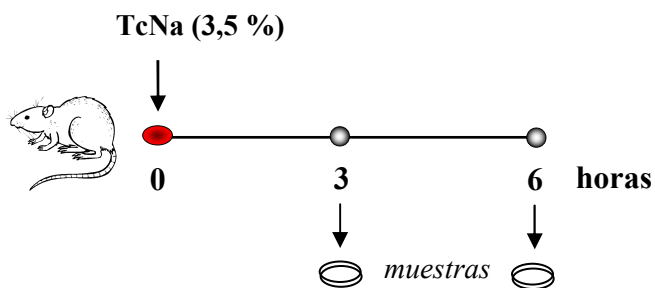
- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| - OBP 3 h (Dx -30 min) | - TcNa 3 h (Dx -30 min) |
| - OBP 3 h (Dx +1 h) | - TcNa 3 h (Dx +1 h) |
| - OBP 12 h (Dx -30 min) | - TcNa 6 h (Dx -30 min) |
| - OBP 12h (Dx +1h) | - TcNa 6 h (Dx +1 h) |

Esquema 1.

modelos de pANCREATITIS



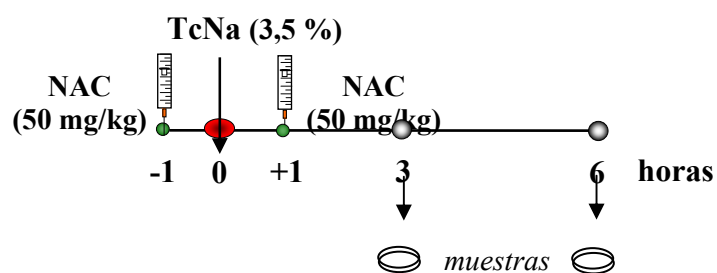
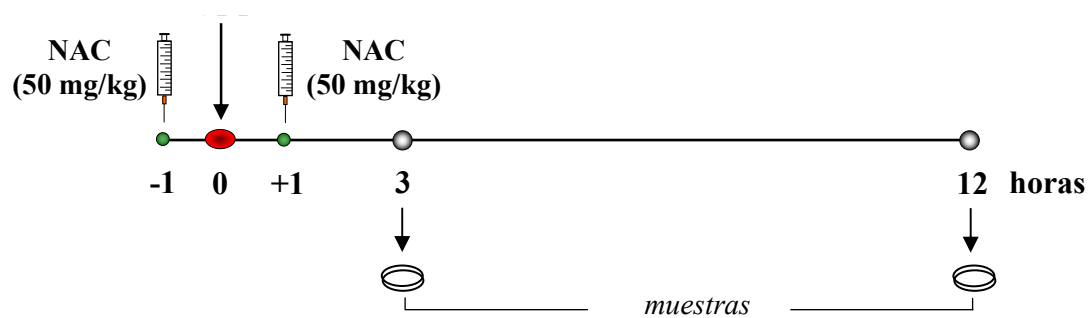
INFUSIÓN RETRÓGRADA DE TAUROCOLATO (TcNa)



tratamientos

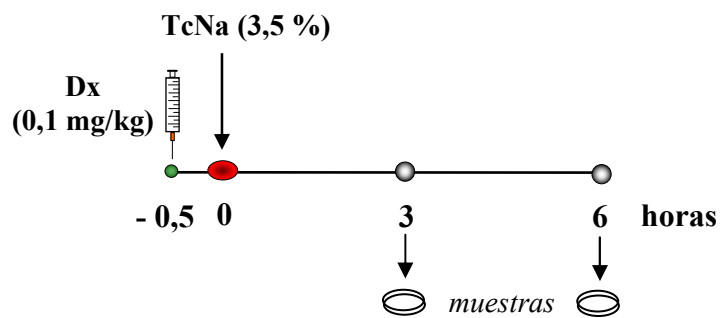
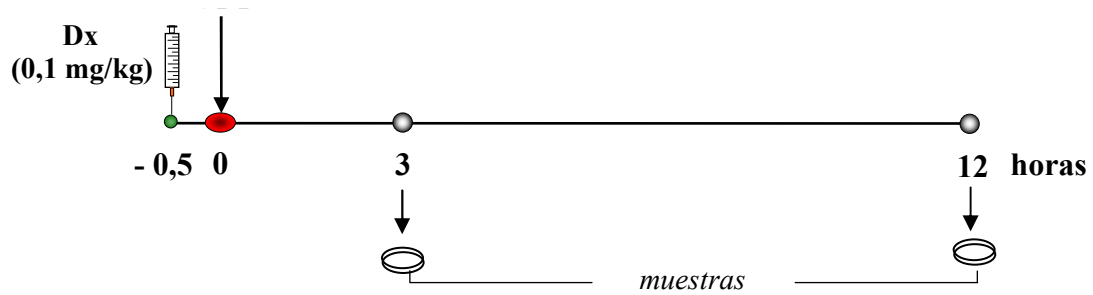
- *ANTIOXIDANTE*

N-ACETILCISTEÍNA (NAC)

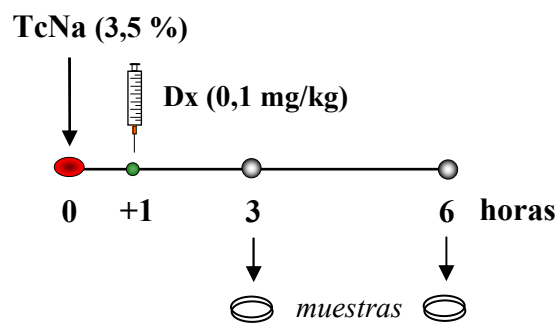
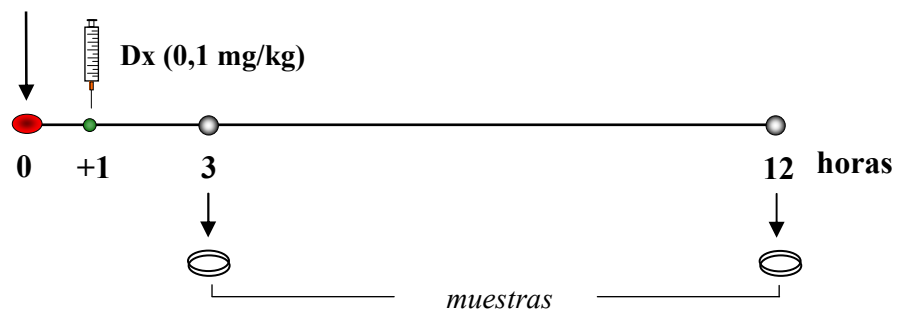


• **ANTI-INFLAMATORIO**

DEXAMETASONA PROFILÁCTICO [(Dx -30 min)]



DEXAMETASONA TERAPÉUTICO [(Dx +1 h)]



3.2.2. ESTUDIOS *IN VITRO* (Esquema 2).

Se realizó un estudio *in vitro* con el objetivo de estudiar los efectos de NAC y Dx sobre la respuesta inflamatoria desencadenada por la célula acinar bajo estimulación con PAAF (fluido ascítico asociado a pancreatitis).

3.2.2.1. Células acinares estimuladas con PAAF.

El PAAF se obtuvo de un grupo de ratas a las que, tras 12 horas de ayuno, se les indujo PA por infusión retrógrada de TcNa (3.5%) siguiendo el método descrito anteriormente. Dieciocho horas después de inducir la PA, el PAAF fue recogido de la cavidad peritoneal por aspiración en condiciones de esterilidad. PAAFs de cinco ratas diferentes se recogió, se mezcló y finalmente se centrifugó a 2500 g durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes obtenidos se pasaron por filtros de 0.2 µm (Millipore). El PAAF resultante fue alicuotado y almacenado a -80° C hasta su uso.

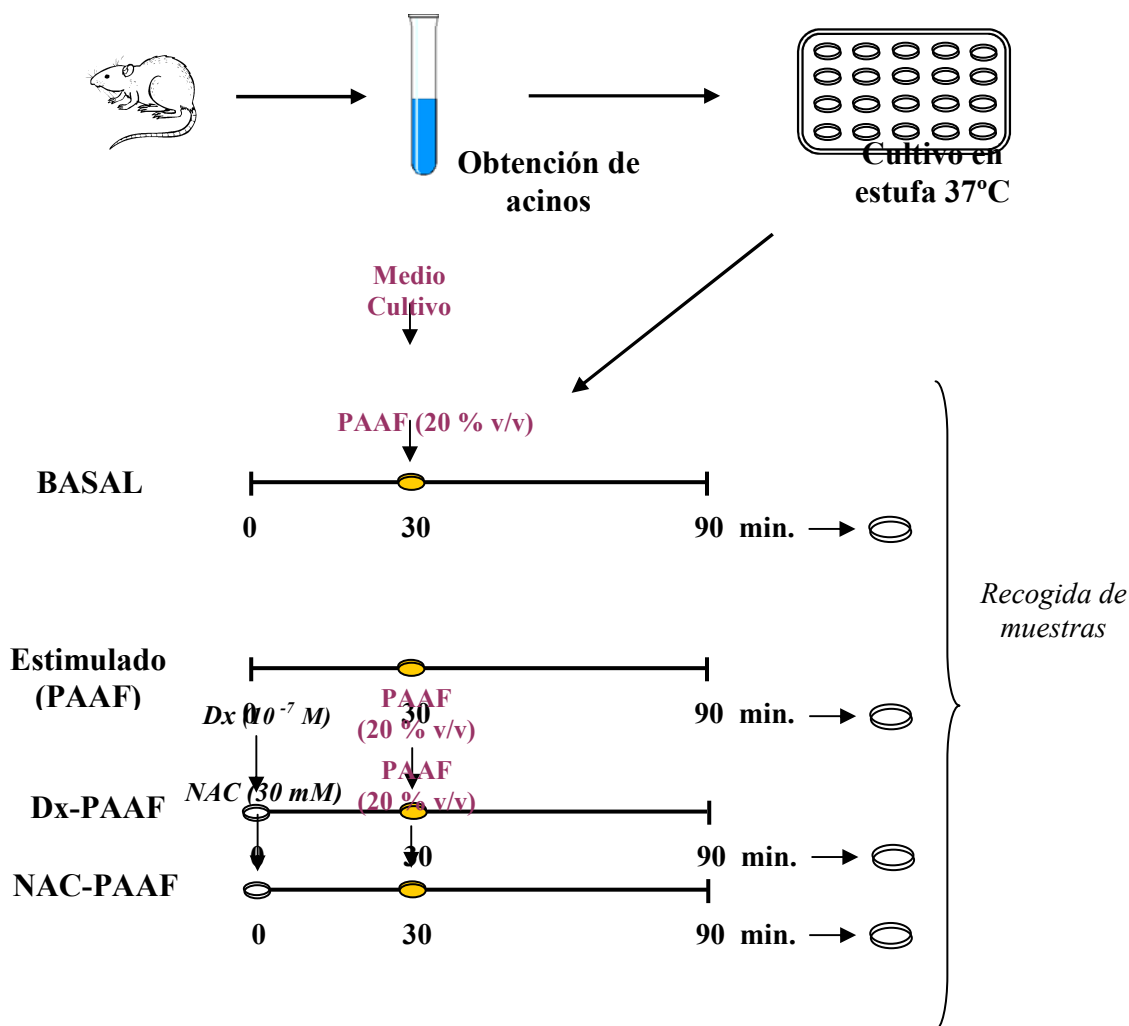
Para el cultivo se utilizaron placas de 24 pocillos en los que se depositaron 400 µl de una suspensión de acinos pancreáticos en Medio 199 (Gibco) suplementado con suero fetal (10 %, v/v) (Biowhittaker), previamente inactivado por calor, y conteniendo estreptomicina (0.1 mg/ml) y penicilina (100 U/ml) (Sigma). Los cultivos se mantuvieron en una estufa (SHEL LAB) a 37°C, en una atmósfera estéril con humedad relativa del 95% y 5% de CO₂. Se prepararon pocillos de cultivo para estudiar la respuesta acinar en ausencia (condiciones basales) y presencia de PAAF (20 % v/v). Para ello, al cabo de 30 minutos iniciales se añadieron respectivamente 100 µl de medio de cultivo o 100 µl de PAAF conteniendo inhibidor de la tripsina (STI) (200 µg/ml) (Sigma), y se prolongó el cultivo durante otros 60 minutos, tiempo de estimulación considerado óptimo de acuerdo con estudios preliminares.

Los resultados se expresaron como diferencias obtenidas en condiciones de estimulación (presencia de PAAF) respecto a las condiciones basales (ausencia de PAAF).

3.2.2.2. Tratamientos.

Para investigar el efecto de agentes antioxidantes y anti-inflamatorios sobre la respuesta inflamatoria acinar, los acinos aislados se preincubaron con NAC (30 mM) (Sigma) o Dx (10⁻⁷ M) (Sigma), respectivamente, durante 30 minutos antes de añadir el medio de cultivo (basal) o el PAAF (estimulado). Una hora después, dichos acinos se retiraron de la estufa y se analizó el efecto de ambos tratamientos tanto en condiciones basales como bajo estimulación con PAAF, comparando la diferencia entre tratados y no tratados.

Esquema 2.



3.3. PARÁMETROS DE DIAGNÓSTICO DE LA SEVERIDAD DE LA PANCREATITIS AGUDA.

3.3.1. ACTIVIDAD AMILASA EN PLASMA.

La actividad amilásica en plasma se determinó mediante la técnica de Noelting y Bernfeld (Noelting y Bernfeld, 1948), modificada por Hickson (Hickson, 1970). Esta técnica se basa en la medida de la capacidad de la enzima amilasa para hidrolizar el almidón, mediante la cuantificación colorimétrica de la maltosa liberada. Los resultados se expresaron en U/dl.

- ✓ Reactivos y soluciones.
- Solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05:
 - Fosfato sódico dibásico anhidro (Merck)
 - Fosfato sódico monobásico anhidro (Merck)
 - 6,7 mM ClNa (Panreac)
- Reactivo de Maltosa:

- 17 mM Ácido 3,5 nitrosalicílico (Fluka)
- 2 N Hidróxido potásico (Probus)
- 400 mM Tartrato potásico (Merck)
- Maltosa (Sigma)
- Almidón (Panreac)

✓ Método.

Se añadieron 100 µl de plasma a una solución de almidón al 2% en solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05. La mezcla se incubó durante 5 min en un baño a 38°C para permitir la reacción de la enzima sobre el almidón y la liberación de la maltosa.

Transcurrido ese tiempo, se añadieron 0,5 ml de la mezcla anterior a 2,5 ml del reactivo de maltosa, se hirvió durante 10 min al baño maría y se dejó enfriar. Se diluyeron 0,5 ml en 5 ml de agua destilada y se midió la absorbancia a 520 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Helios Gamma y Delta), frente a un blanco de solución amortiguadora fosfato 20 mM, ClNa 6,7 mM, pH 7,05, sometido a las mismas condiciones de reacción. A los valores de densidad óptica obtenidos en las muestras de plasma se restó el valor que resultó de la misma reacción enzimática sobre un tubo sustrato de almidón 2%, cuya absorbancia corresponde a la maltosa liberada de la solución de almidón de forma espontánea.

Los datos obtenidos se compararon con los de una recta patrón realizada previamente con soluciones de maltosa de concentraciones conocidas comprendidas entre 0,5 y 8 mg/ml, preparadas en solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,05.

3.3.2. PORCENTAJE DE FLUIDO EN TEJIDO PANCREÁTICO.

El tejido pancreático se pesó para conocer su peso fresco y se procedió después a su deshidratación en un horno (Heraeus) durante 72 h a 100°C. Transcurrido este tiempo, el porcentaje de peso seco se calculó sobre el peso fresco ya estimado (considerado como el 100%), y el valor del porcentaje de fluido en páncreas se obtuvo a partir de la siguiente fórmula: porcentaje de fluido (%) = 100 - (Peso seco x 100)/Peso fresco.

3.3.3. HEMATOCRITO.

Una vez extraída la sangre heparinizada por punción cardíaca se llenaron capilares de microhematocrito, que se centrifugaron a 4.000 g durante 6 min en una centrífuga de microhematocrito (GRI-CEL). Los resultados se expresaron como porcentaje de células sanguíneas en sangre total.

3.3.4. VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN HOMOGENADOS DE PÁNCREAS: ANÁLISIS DE GLUTATIÓN.

La determinación de glutatión (GSH) en páncreas se llevó a cabo mediante la técnica de Tietze (Tietze F, 1969), basada en la monitorización espectrofotométrica de la reducción del 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) mediada por el GSH. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol GSH/g páncreas}$.

- ✓ Reactivos y soluciones.

- Tampón Griffit:

- 100 mM Fosfato sódico monobásico (Merck)
- 6 mM EDTA (etilendiamina-ácido tetraacético) (Sigma)

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 10 N

- 3 mM DTNB (Sigma) en tampón Griffit

- 6 mM NADPH (β -nicotinamido-adenín-dinucleótido fosfato, forma reducida) (Sigma) en tampón Griffit

- GSH reductasa tipo III (Sigma)

- Ácido clorhídrico (Merck)

- Ácido sulfosalicílico (Merck)

- ✓ Método.

Después de pesar el páncreas, la glándula se sumergió en una solución de sulfosalicílico al 5%, se cortó finamente con tijeras y se homogeneizó a una velocidad de 20.500 rpm durante 20 segundos con ayuda de un homogeneizador eléctrico (Heidolph Diax 600), manteniéndose en hielo durante todo el proceso. El homogenado resultante se centrifugó durante 15 min a 150 g y 4°C. El sobrenadante se diluyó (1:100) con HCl 0,01 N y se utilizó para la reacción enzimática.

En un baño termostataado a 30°C, se mezclaron 200 μl de muestra con 700 μl de solución NADPH y 100 μl de solución DTNB en tampón Griffit. Tras añadir 10 μl de enzima GSH reductasa (0,5 U) se midió el incremento de densidad óptica/minuto durante 5 min, en un espectrofotómetro termostataado (Helios Gamma y Delta) y a una longitud de onda de 420 nm. A los resultados obtenidos se restó el valor de un blanco que contenía 200 μl de tampón Griffit en lugar de la muestra, que fue sometido a la misma reacción.

Los valores se compararon con una recta patrón realizada cada día, con concentraciones de GSH conocidas que oscilaban entre 0,325 y 6,51 $\mu\text{mol/L}$.

3.3.5. VALORACIÓN DE LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN PÁNCREAS Y PULMÓN.

Se determinó a través de la medida de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), según la técnica descrita por Bhatia y cols. (Bhatia y cols., 1998). El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica del producto de la reacción de la MPO sobre el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

- ✓ Reactivos y soluciones.
- Solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7,4
- Solución amortiguadora fosfato 50 mM, pH 6,0
- HDTAB (hexadeciltrimetilamonibromuro) (Sigma)
- TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (Sigma)
- Ácido sulfúrico (Merk)

- ✓ Método.

A las muestras de tejido pancreático y pulmonar, que habían sido inmediatamente congeladas a -80°C tras su extracción, se añadió 1 ml de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4. Una vez descongelado, el tejido se cortó finamente con tijeras y se homogeneizó después durante 20 seg a 20.500 rpm con un homogeneizador eléctrico (Heidolph Diax 600), manteniendo la muestra en un recipiente con hielo. El homogenado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 min y a 4°C en una microcentrífuga (Eppendorf miniSpin-plus). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 6,0 conteniendo HDTAB al 5%. La suspensión resultante se sometió a cuatro ciclos consecutivos de congelación y descongelación, y tras la última descongelación se sonicó la muestra durante 40 seg en un sonicador (Soniprep 150), y se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 5 min. El sobrenadante resultante se diluyó en tampón fosfato 50 mM, pH 6,0 conteniendo HDTAB al 5% y se incubó con TMB, sustrato de la mieloperoxidasa, durante 110 seg, en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción se paró añadiendo H₂SO₄ 180 mM y se midió la absorbancia inmediatamente a 450 nm en un espectrofotómetro (UNICAM 8625). A los resultados obtenidos se restó el valor de un blanco que se obtuvo incubando TMB con el tampón fosfato utilizado para diluir las muestras y procesado en las mismas condiciones.

Los resultados se expresaron como veces de aumento de la actividad de la enzima con respecto a la actividad de dicha enzima obtenida cada día en muestras control.

3.3.6. ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) EN PÁNCREAS E HÍGADO.

La actividad LDH se valoró en homogenados de páncreas e hígado según el método de Gutmann y Wahlefeld (Gutmann y Wahlefeld, 1974), con el fin de determinar la viabilidad celular.

- ✓ Reactivos y soluciones.

- Solución Tris/CINa
 - 81,3 mM Trizma (Sigma)
 - 203,3 mM CINa (Panreac)
- Solución Tris/CINa/NADH
 - 81,3 mM Trizma
 - 203,3 mM CINa
 - 0,244 mM NADH (Nicotinamido-adenín-dinucleótido reducido) (Sigma)
- Solución Tris/CINa/Piruvato
 - 81,3 mM Trizma
 - 203,3 mM CINa
 - 9,76 mM Piruvato (Sigma)

En todas estas soluciones se ajustó el pH a 7,2

✓ **Método.**

El tejido se cortó finamente con tijeras y se homogenizó con solución Tris/CINa en proporción 1gr tejido/1 ml solución Tris/CINa, a una velocidad de 20.500 rpm con ayuda de un homogenizador eléctrico (Heidolph Diax 600), manteniéndose en hielo durante todo el proceso. Todas las soluciones se termostataron en un baño a 30°. A continuación, se mezclaron 625 µl de solución Tris/CINa/NADH con 125 µl de solución Tris/CINa/Piruvato, se agitó y se añadieron 12,5 µl de homogenado diluido con solución Tris/CINa, (1:200) para el hígado y (1:10) para el páncreas. A una longitud de onda de 339 nm, se midió el incremento de la absorbancia en un minuto, debida a la formación del NAD⁺ en un espectrofotómetro termostatado (Helios Gamma y Delta) dejando un tiempo de latencia de 30s antes de realizar la primera medida de absorbancia. Los resultados se expresaron en U/ml.

3.3.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PÁNCREAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA.

Se realizó el análisis morfológico de secciones de páncreas teñidas con hematoxilina-eosina y observadas al microscopio óptico.

✓ **Reactivos y soluciones.**

- Solución amortiguadora fosfato 0,1 M, pH 7,4
- Solución CINa 150 mM
- Formaldehído (Merck)
- Etanol (Merck)
- Tolueno (Merck)
- Xilol (Merck)

- Fenol (Merck)
- Parafina (Vogel Histo-Comp[®])
- Solución de Gelatina (Sigma) al 0,5%
- Hematoxilina de Carazzi:
 - 20% Glicerina (Merck)
 - 3,3 mM Hematoxilina (Merck)
 - 0,9 mM Iodato potásico (Merck)
 - 105 mM Sulfato de aluminio y potasio 12-hidrato (Merk)
- Solución de Eosina 14,4 mM (Merck)
- Bálsamo de Canadá (Merck)

✓ **Método.**

Tras extraer y lavar con suero salino los páncreas, se cortaron en trozos de un tamaño aproximado de 0,5 cm y se fijaron inmediatamente después con formaldehído al 4%, durante 2h a temperatura ambiente. Después de eliminar el fijador mediante lavados con tampón fosfato, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación gradual en alcoholes de graduación creciente. Después se incluyeron en parafina, previamente fundida en una estufa a 60°C, en la que se mantuvieron durante al menos 24 h antes de proceder a su colocación en el molde correspondiente. Una vez solidificados, los bloques de parafina con las muestras incluidas se almacenaron a 4°C.

En un microtomo de tipo Minot se obtuvieron, a partir de los bloques de parafina convenientemente tallados, secciones seriadas de 5 µm de espesor, que se recogieron sobre portas gelatinizados a 37°C, y se mantuvieron durante 24 h en una estufa a 60°C. Una vez secas, las preparaciones se desparafinaron y se hidrataron, pasando en esta ocasión por una serie de alcoholes de gradación decreciente y agua en último lugar. En el proceso de tinción, las secciones se mantuvieron inmersas en solución de hematoxilina de Carazzi durante 2 min y, después de lavar el exceso de solución con agua corriente durante 15 min, en solución de eosina durante 5 min. Por último se procedió a una nueva deshidratación con alcoholes y, una vez completado este proceso, se colocó un cubre encima de cada porta, que se fijó con bálsamo de Canadá.

Para determinar de forma fiable las características morfológicas del páncreas se realizó bajo microscopio óptico la observación ciega de diferentes secciones de tejido de cada uno de los grupos experimentales. Se realizó un estudio semicuantitativo de las alteraciones histológicas en 10-12 campos consecutivos acorde con un sistema de puntuación. El edema intersticial se valoró como: 0, ausencia; 1, expansión septo

interlobular; 2, expansión septo intralobular; y 3, acinos individuales separados. La infiltración de células inflamatorias, la vacuolización y la necrosis se valoraron como presencia relativa al área examinada: 0, ausencia; 1, <20%; 2, 20%-50%; 3, >50%.

3.3.8. VALORACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS.

✓ Método.

El número total de leucocitos se evaluó en un contador Coulter (Bayer, ADVIA 120) y los resultados se expresaron en número total de leucocitos por μ l de sangre.

Para el análisis de poblaciones leucocitarias, 200 μ l de sangre se incubaron en oscuridad con 5 μ l anticuerpo monoclonal frente a CD45 marcado con ficoeritrina-cianina 5 (anti-CD45-PE/Cy5) (BD Biosciences Pharmingen), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 2 ml de solución de lisis FACS (Becton Dickinson Biosciences) y se incubó nuevamente durante 15 min, a temperatura ambiente y en oscuridad para lisar los eritrocitos. Tras centrifugar durante 5 min a 540 g, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 2 ml de PBS (5 min, 540 g), se decantó y se resuspendió de nuevo en 0,5 ml de PBS para su posterior adquisición y análisis en el citómetro de flujo. La adquisición y análisis se realizó utilizando los programas informáticos Cell Quest y Paint-a-Gate PRO, respectivamente (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA). Tres poblaciones diferentes fueron seleccionadas dentro de las células CD45 positivas para identificar los linfocitos, monocitos y neutrófilos de acuerdo con las propiedades específicas de cada población de forward light scatter (FSC)/side light scatter (SSC). Los resultados de cada población se expresaron en valores porcentuales respecto a leucocitos totales.

3.4. MEDIADORES INFLAMATORIOS.

Se analizó la expresión de distintos mediadores inflamatorios involucrados en la fisiopatología de la PA, como las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina, las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , o las quimiocinas MCP-1 y CINC. Dichos mediadores se estudiaron en distintos niveles: tejido pulmonar y pancreático, célula acinar, leucocitos circulantes y plasma.

3.4.1. PULMÓN, PÁNCREAS Y CÉLULA ACINAR.

A. Recogida de tejido pulmonar y pancreático.

Bajo anestesia del animal con pentobarbital sódico (1 mg/100 g peso corporal), se extrajeron los pulmones y el páncreas del animal. Para recoger las muestras de pulmón, se practicó una toracotomía media para acceder al interior de la cavidad torácica. Dichas muestras se lavaron del exceso de sangre y se congelaron en trozos en nitrógeno líquido hasta su utilización para la obtención de ARN.

El tejido pancreático extirpado, se lavó inmediatamente en una solución de ClNa 150 mM a 4°C para retirar los hematíes, y después se eliminó el tejido graso y nódulos linfáticos circundantes. Parte del tejido extraído se utilizó para la obtención de acinos y células acinares y el resto se congeló en nitrógeno líquido para la obtención posterior de ARN.

B. Aislamiento de acinos y células acinares.

✓ Reactivos y soluciones.

- Solución de aislamiento:

- 25 mM HEPES
- 125 mM ClNa (Merck)
- 4,8 mM ClK (Merck)
- 1,2 mM Cl₂Mg (Merck)
- 1,2 mM NaH₂PO₄ (Merck)
- 14 mM Glucosa (Merck)
- 2 mM Glutamina (Sigma)
- 0,01% (p/v) STI (Sigma)
- 0,2% Albúmina bovina (Sigma)
- 2% (v/v) Solución de aminoácidos (Sigma)
- 0,5 mM Cl₂Ca (Merck)
- 240 U/ml Colagenasa tipo XI (Sigma)

Se ajustó el pH a 7,4 con NaOH 10 N

- Solución de lavado:

- 25 mM HEPES (Sigma)
- 125 mM ClNa (Merck)
- 4,8 mM ClK (Merck)

- 1,2 mM Cl_2Mg (Merck)
- 1,2 mM NaH_2PO_4 (Merck)
- 14 mM Glucosa (Merck)
- 2 mM Glutamina (Sigma)
- 0,01% (p/v) STI (Sigma)
- 1% Albúmina bovina (Sigma)
- 2% (v/v) Solución de aminoácidos (Sigma)
- 2 mM Cl_2Ca (Merck)

Se ajustó el pH a 7,4 con NaOH 10 N

- Solución amortiguadora fosfato 100 mM conteniendo ClNa 150 mM, (PBS) pH 7,4

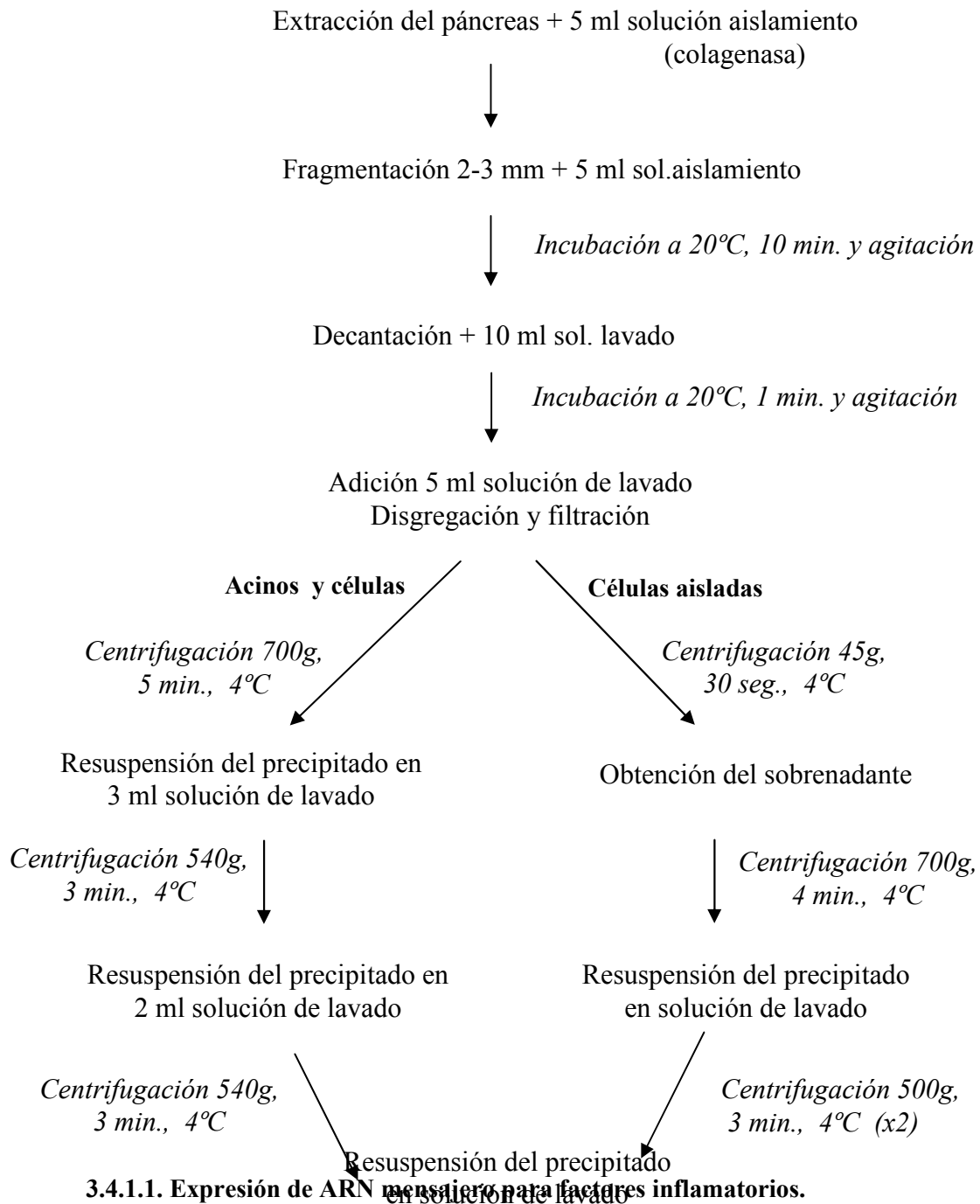
✓ Método (Esquema 3).

Para aislar **acinos**, se siguió el protocolo descrito por Ramudo y cols., (2005a). El páncreas se digirió en solución de aislamiento conteniendo colagenasa, la cual había sido previamente gasificada con carbógeno (95% O_2 /5% CO_2) y mantenida a 4°C. A continuación se troceó en fragmentos de 2 a 3 mm aproximadamente, y se incubó durante 10 min a 20°C en un baño termostático (GFL 1803) y con agitación (200 ciclos/min). A continuación se desechó el medio por decantación y se añadieron 10 ml de solución de lavado para eliminar los restos de la digestión y la propia colagenasa incubando durante 1 min con agitación a 20°C. Finalmente se decantó y se añadieron otros 5 ml de solución de lavado. La suspensión resultante, que contenía los acinos agrupados, se disgregó de forma mecánica, haciéndola pasar por puntas de pipeta de diámetro sucesivamente menor (3, 2 y 1 mm). La muestra se filtró a través de una gasa para retirar agregados de acinos demasiado grandes, y el filtrado, conteniendo células acinares y acinos, se centrifugó a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf, 5403) a 700 g durante 7 min. El precipitado se resuspendió en 3 ml de solución de lavado y se centrifugó dos veces a 540 g durante 3 minutos a 4 °C. El precipitado final, se resuspendió en 1 ml de solución de lavado para ser usado para los distintos experimentos.

Para obtener **células acinares aisladas**, se modificó el protocolo de centrifugaciones con el fin de eliminar los acinos (Uruñuela y cols., 2002b). El filtrado obtenido, se centrifugó a 45 g durante 30 seg a 4°C para separar los acinos. El sobrenadante conteniendo las células acinares, se centrifugó a 700 g durante 4 min a 4°C y el precipitado resultante una vez resuspendido en solución de lavado, se centrifugó dos veces 3 min a 4°C y 500 g. El precipitado final se resuspendió en 1 ml de solución de lavado, utilizando las células aisladas para los

distintos experimentos tras proceder a su recuento en una cámara Neubauer. La viabilidad celular se comprobó por el método de exclusión con azul tripan.

Esquema 3. AISLAMIENTO DE ACINOS Y CÉLULAS ACINARES



3.4.1.1. Expresión de ARNm mensajero para factores inflamatorios.

En experimentos *in vivo*, se analizó la expresión de ARNm de ICAM-1, P-selectina, MCP-1 y CINC en pulmón, páncreas y célula acinar. En experimentos *in vitro*, se estudió la expresión de MCP-1, ICAM-1 en célula acinar en respuesta a PAAF.

-
- 3.4.1.1.A. Extracción del ARN total.

- ✓ Reactivos y soluciones.
- Rneasy® mini kit, (Qiagen)
- Agarosa NuSieve® 3:1 (Cambrex Bio Science)
- Bromuro de etidio (Sigma)

✓ **Método.**

Se utilizó el kit comercial Rneasy® de extracción de ARN, cuya técnica se basa en la unión del ARN a membranas de silicagel de las columnas de extracción y su posterior lavado y elución con solventes adecuados. Para los análisis en **tejido** se trituraron 20 mg de tejido pulmonar o pancreático previamente congelados en nitrógeno líquido, y se les añadió 700 µl de RLT con β-mercaptoetanol. La mezcla resultante se centrifugó a 14.000 g, 3 min y el sobrenadante se mezcló (v/v) con etanol al 70% justo antes de añadirlo a las columnas de extracción para seguir el protocolo del fabricante. Para la obtención de ARN de **células** se partió de 2×10^6 de células acinares aisladas que se resuspendieron en RLT con β-mercaptoetanol, las cuales se homogenizaron pasándolas por jeringas de insulina. A partir de aquí se continuó con el protocolo de igual forma que con el tejido. La obtención de ARN total se realizó en presencia de ADNasa.

La pureza y concentración de ARN se valoró midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. La integridad del ARN obtenido se comprobó después de realizar una electroforesis en geles de agarosa al 1,25% conteniendo bromuro de etidio y visualizar con luz ultravioleta las bandas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, con ayuda de un visor de geles (Gel Doc 1000/2000 image analysis system, Bio-Rad).

3.4.1.1.B. RT-PCR semicuantitativa (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).

El ARNm se valoró por la técnica de RT-PCR. Para ello, primero se obtuvo el ADN complementario por la acción de la transcriptasa reversa a partir del ARN total obtenido previamente. A continuación, el ADN complementario sintetizado se amplificó en las secuencias específicas para las proteínas sometidas a estudio gracias a la enzima Taq ADN polimerasa.

-
- ✓ Reactivos y soluciones.
 - - Kit 1st Strand cDNA Syntesis for RT-PCR (Roche)
 - - Kit Taq DNA Polymerase, dNTPack (Roche)
 - - Patrón de productos de ADN de tamaño conocido (Plus DNA ladder 1Kb) (Invitrogen)

- Secuencias primers (Roche)

PRIMERS	SECUENCIA
MCP-1 Forward	5'- CACTATGCAGGTCTCTGTCACG-3'
MCP-1 Reverse	5'- GACTCACTTGGTTCTGGTCCA-3'
CINC Forward	5'- CTCCAGCCACACTCCAACAGA-3'
CINC Reverse	5'- CACCCTAACACAAAACACGAT-3'
ICAM-1 Forward	5'-GGGTTGGAGACTAACTGGATGA-3'
ICAM-1 Reverse	5'-GGATCGAGCTCCACTCGCTC-3'
P-selectina Forward	5'- ACCATTGGGAGCTACACCTG -3'
P-selectina Reverse	5'- AGGTTGGCAATGGTTCACTC-3'
β -actina Forward	5'-CACGGCATTGTAACCAACTG-3'
β -actina Reverse	5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'

✓ Método.

La síntesis de cADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial 1st Stand cDNA Síntesis kit para RT-PCR según el siguiente protocolo: 1 μ g de ARN total en 20 μ l de volumen final de reacción conteniendo una mezcla de tampón de cADN síntesis, $MgCl_2$ (25 mM), dNTPs (desoxi- rribonucleótidos trifosfato) mix (10 mM de cada dNTP), primer oligo dT (0.8 μ g/ μ l), inhibidor de ARNasas (50 U/ μ l) y enzima transcryptasa AMV reversa (20 U). La síntesis tuvo lugar en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) según las siguientes condiciones: 10 min a 25°C y 60 min a 42°C, 5 min a 99°C y 5 min a 4°C. El cADN sintetizado se almacenó a -80°C hasta su amplificación por PCR.

La PCR se realizó utilizando el kit comercial Taq DNA Polymerase, dNTPack. Se preparó un Master Mix1 con un Mix PCR de nucleótidos (200 μ M de cada dNTP), primers de cada proteína a amplificar (0,4 μ M), y cADN (250 ng). Master Mix2 se preparó con agua libre de ARNasas, tampón PCR conteniendo 1,5 mM $MgCl_2$, y enzima Taq ADN polimerasa (5 U/ μ l). La mezcla del Master Mix1 y el Master Mix2 se sometió finalmente a amplificación en el termociclador siguiendo las características

específicas de desnaturalización, anillamiento y elongación de cada proteína que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1.

<u>PROTEÍNA</u>	<u>TAMAÑO</u>	<u>PCR</u>
β- actina	400 pb	94°C, 2 min
MCP-1	294 pb	94°C, 30 seg
CINC	600 pb	56°C, 45 seg
		72°C, 45 seg
		72°C, 7 min
		(x 30)
ICAM-1	182 pb	94°C, 5 min
		94°C, 30 seg
		56°C, 30 seg
		68°C, 45 seg
		68°C, 7 min
		(x 25)
P-selectina	427 pb	94°C, 2 min
		94°C, 15 seg
		55°C, 30 seg
		72°C, 1 min
		72°C, 7 min
		(x 29)

Para comprobar la presencia de un único producto de reacción del tamaño esperado se realizó una electroforesis de 8 μ l de producto de PCR en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se comparó con la distribución electroforética de un patrón comercial conteniendo productos de tamaño conocido. La valoración semiquantitativa del ADN se realizó por el análisis de la densidad de las bandas con la ayuda del programa QuantityOne (Bio-Rad). La intensidad de la banda de cada proteína se normalizó con la de la banda de la β -actina de la misma muestra, y el cociente resultante refleja la expresión de ARNm. Los resultados se expresaron como veces de aumento respecto a controles (en estudios *in vivo*) o respecto a condiciones basales (en estudios *in vitro*).

3.4.1.2. Expresión de ICAM-1 en la membrana de células acinares.

El estudio se llevó a cabo por citometría de flujo en células acinares aisladas, mediante un marcaje de superficie utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 marcado con ficoeritrina (anti-CD54-PE).

✓ **Reactivos y soluciones.**

- Anticuerpo monoclonal frente a ICAM-1 de rata obtenido en ratón marcado con ficoeritrina (anti-CD54-PE) (Santa Cruz Biotechnology)
- Inmunoglobulina G (IgG₁) isotipo control (negativo) de ratón marcado con ficoeritrina
- Solución amortiguadora fosfato 100 mM, conteniendo ClNa 150 mM, pH 7,4 (PBS)

✓ **Método (Esquema 4).**

El análisis se llevó a cabo como se detalla en el esquema 4.

La fluorescencia no específica se determinó en células acinares incubadas con isotipo de ratón marcado con IgG₁-PE.

Los resultados se expresaron como porcentaje de variación respecto a la intensidad de fluorescencia media observada en ratas control analizadas en paralelo.

Esquema 4.

EXPRESIÓN DE ICAM-1 EN CÉLULAS ACINARES

100 µl (10⁶ cels.) suspensión celular + anti-CD54-PE (3 µg/ml)



15 min, oscuridad y agitación

Centrifugación 500 g, 3 min en 2 ml de PBS (x2)



Resuspensión en 200 µl de PBS



Adquisición en el citómetro de flujo

3.4.2. VALORACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LEUCOCITOS CIRCULANTES.

Se valoró la expresión de citocinas (TNF- α), quimiocinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM-1) en leucocitos de sangre periférica.

3.4.2.1. TNF- α y MCP-1

Se midió la producción de la citocina TNF- α y de la quimiocina MCP-1 en monocitos de sangre periférica sometidos a estimulación con lipopolisacárido (LPS).

✓ Reactivos y soluciones.

- RPMI 1640 (Biowhittaker)
- 2 mM L-Glutamina (Sigma)
- Kit fijador / permeabilizante (FIX&PERM) (Caltag Laboratories)
- Brefeldina A (Sigma)
- Lipopolisacárido (LPS) obtenido de *E. coli* serotipo 055:B5 (Sigma)
- Anticuerpo monoclonal frente a CD45 de rata obtenido en ratón y marcado con ficoeritrina-cianina 5 (anti-CD45-PE/Cy5) (BD Biosciences Pharmingen)
- Anticuerpo monoclonal frente a TNF- α de rata obtenido en hámster marcado con ficoeritrina (anti-TNF- α -PE) (BD Biosciences Pharmingen)
- Anticuerpo monoclonal frente a MCP-1 de rata obtenido en hámster marcado con ficoeritrina (anti-MCP-1- α -PE) (BD Biosciences Pharmingen)
- Inmunoglobulina G (IgG₁) isotipo control (negativo) de ratón marcado con ficoeritrina
- Inmunoglobulina G (IgG₁) isotipo control (negativo) de hámster marcado con ficoeritrina
- Solución amortiguadora fosfato 100 mM con ClNa 150 mM y pH 7,4 (PBS)

✓ Método (Esquema 5).

Se utilizó la técnica de doble marcaje con fluorocromos distintos para identificar CD45 de superficie y citocina/quimiocina intracelular. El análisis se realizó mediante una técnica de inmunofluorescencia directa basada en la tinción doble con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromo: el anticuerpo anti-CD45-PE/Cy5, para identificar las diferentes subpoblaciones leucocitarias, y los anticuerpos anti-TNF- α -PE y anti-

La expresión de estos mediadores inflamatorios se valoró como porcentaje de variación respecto a la intensidad de fluorescencia media obtenida en ausencia de LPS (producción espontánea). Las muestras de ratas control fueron analizadas en paralelo con cada grupo experimental.

PRODUCCIÓN DE TNF- α y MCP-1 EN MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

37°C, 5 h

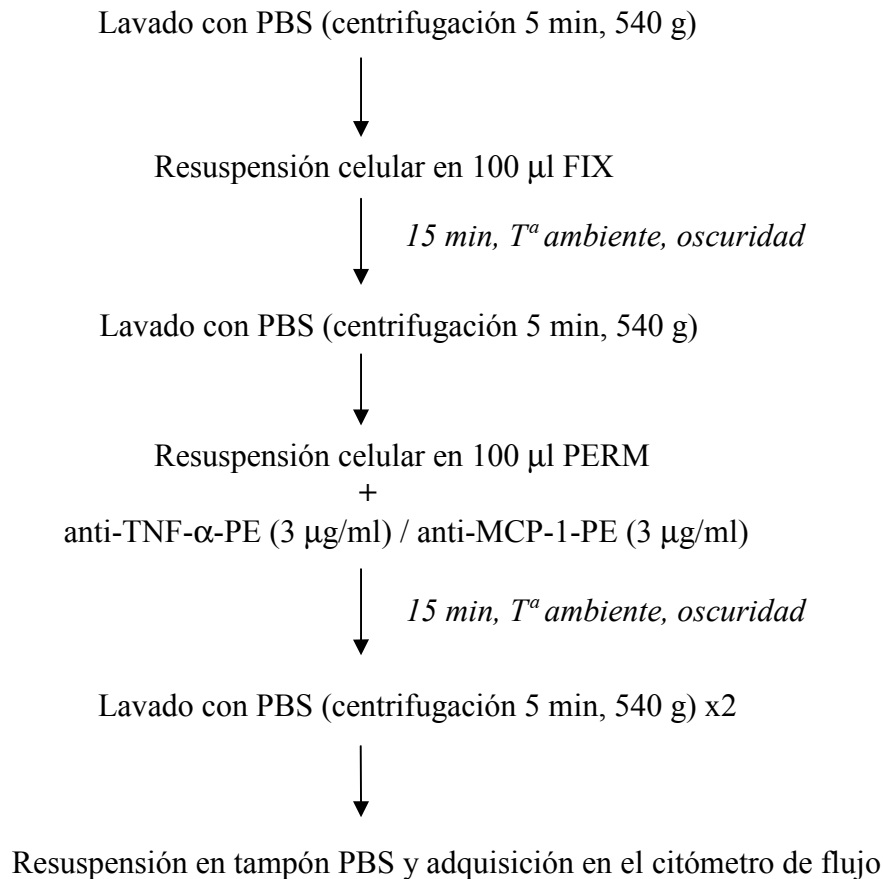
↓

+ 500 µl sangre
± LPS (10 µg/ml)

100-200 µl (10⁶ cels.)
+ anti-CD45-PE/Cy5 (3 µg/ml)

↓

15 min. Tª ambiente. oscuridad



3.4.2.2. ICAM-1.

Se midió la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 así como la expresión de CD45 en monocitos de sangre periférica mediante marcaje de superficie.

✓ Reactivos y soluciones.

- Solución de lisis FACS (Becton Dickinson Biosciences)
- Anticuerpo monoclonal frente a CD45 de rata obtenido en ratón y marcado con ficoeritrina-cianina 5 (anti-CD45-PE/Cy5) (BD Biosciences Pharmingen)
- Anticuerpo monoclonal frente a ICAM-1 de rata obtenido en ratón marcado con ficoeritrina (anti-CD54-PE) (Santa Cruz Biotechnology)
- Inmunoglobulina G (IgG₁) isotipo control (negativo) de ratón marcado con ficoeritrina
- Solución amortiguadora fosfato 100 mM conteniendo ClNa 150 mM, pH 7,4 (PBS)

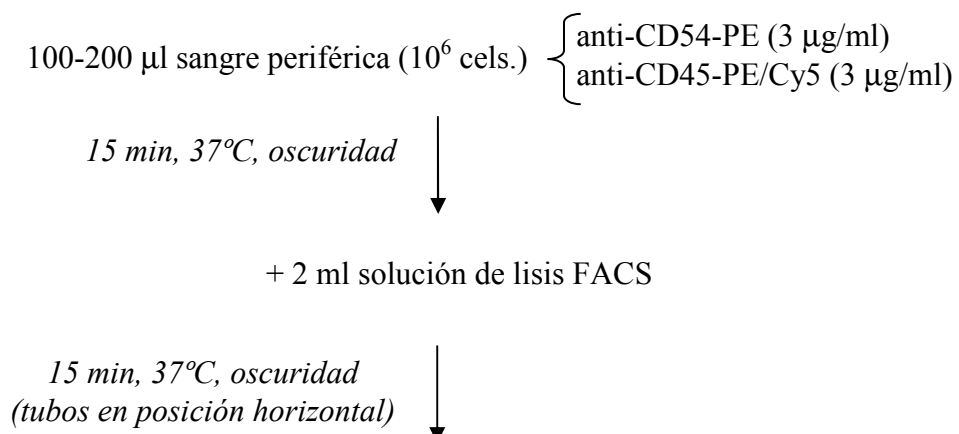
✓ Método (Esquema 6).

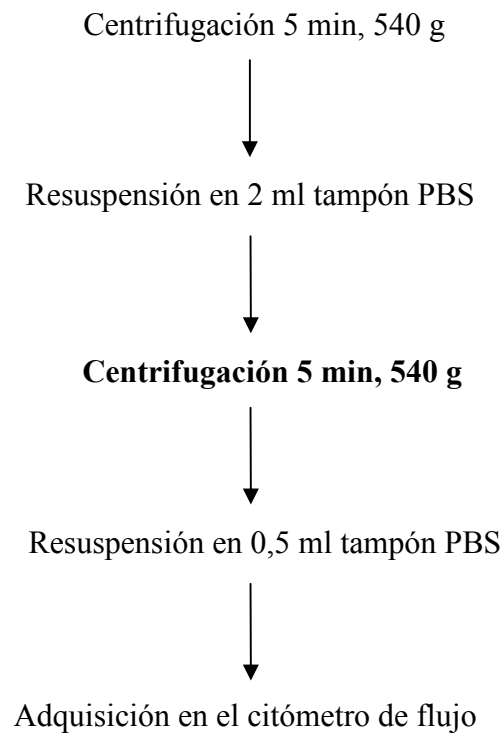
Se siguió el protocolo especificado en el esquema 6, para analizar la expresión en superficie de CD45 e ICAM-1. Para ello se utilizó el anticuerpo anti-CD45-PE/Cy5, y el anticuerpo anti-CD54-PE para el marcaje de CD45 e ICAM-1 respectivamente.

En el caso de CD45, los resultados se expresaron en unidades de intensidad de fluorescencia, y en el caso de ICAM-1, como porcentaje de variación respecto a la intensidad de fluorescencia media obtenida en el control.

Esquema 6.

EXPRESIÓN DE ICAM-1 EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA





3.4.3. VALORACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN PLASMA.

Mediante la técnica de ELISA, se determinaron en plasma las concentraciones de la molécula de adhesión ICAM-1, de las interleucinas IL-6 e IL-1 β , y de las quimiocinas MCP-1 y CINC, utilizando los kits comerciales correspondientes para sICAM-1 y CINC (R&D Systems), y los kits comerciales correspondientes para IL-6, IL-1 β y MCP-1 (Bender MedSystems). En esta reacción primero se produce la unión de las moléculas de estos mediadores presentes en la muestra de plasma a sus respectivos anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1, anti-IL-6, anti- IL-1 β , anti-MCP-1 o anti-CINC, anclados en los pocillos de la placa de ELISA. Posteriormente tiene lugar la unión a este complejo de un segundo anticuerpo, que lleva unida una molécula de biotina. A ella se unirá luego la avidina, sustancia con gran afinidad por la biotina, que

se añade asociada a una molécula de la enzima peroxidasa, de manera que la adición posterior de un sustrato de dicha enzima desencadena una reacción cuyo producto proporciona un color azulado a la muestra. La reacción se detiene añadiendo una solución que hace virar el color azul a amarillo. En un lector de placas UVM 340 se midió la intensidad de dicho color en cada pocillo a longitud de onda de 450 nm. La densidad óptica resultante es directamente proporcional a la concentración de dichos mediadores inflamatorios presentes en la muestra.

Una recta patrón realizada cada día con soluciones de concentraciones conocidas de estos mediadores se utilizó como referencia para extrapolar los resultados que se expresaron en pg/ml (IL-6, IL-1 β) o ng/ml (ICAM-1, MCP-1, CINC).

El protocolo aplicado en cada caso se ajustó estrictamente a las condiciones especificadas por el fabricante.

3.5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS ACINARES.

3.5.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.

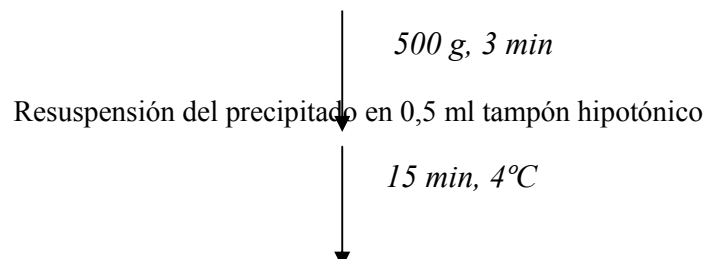
3.5.1.1. Extractos Nucleares. (Esquema 7).

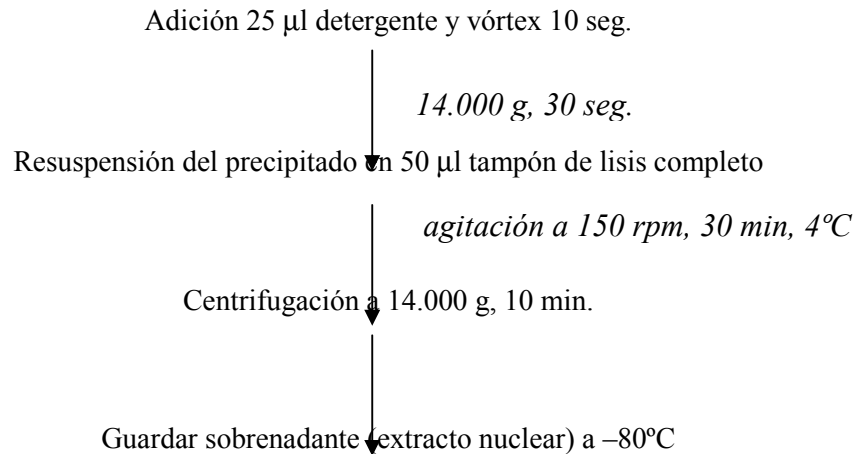
Los extractos nucleares se obtuvieron utilizando un kit comercial específico (Active Motif) según el siguiente esquema:

Esquema 7.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DE CÉLULAS ACINARES

Células acinares (15×10^6 cels.) + 5 ml PBS + inhibidores de fosfatasas (2 %, v/v)





3.5.1.2. Extractos Citoplasmáticos (Esquema 8).

✓ Reactivos y soluciones

- Solución PBS-EDTA:

- 1 mM Etilendiamina-ácido tretraacético (EDTA) (Sigma)
- Solución amortiguadora fosfato 100 mM con ClNa 150 mM, pH 7,4 (PBS)

- Solución HEPES:

- 10 mM HEPES (Sigma)
- 2 mM EDTA (Sigma)
- 25 mM ClK (Merk)

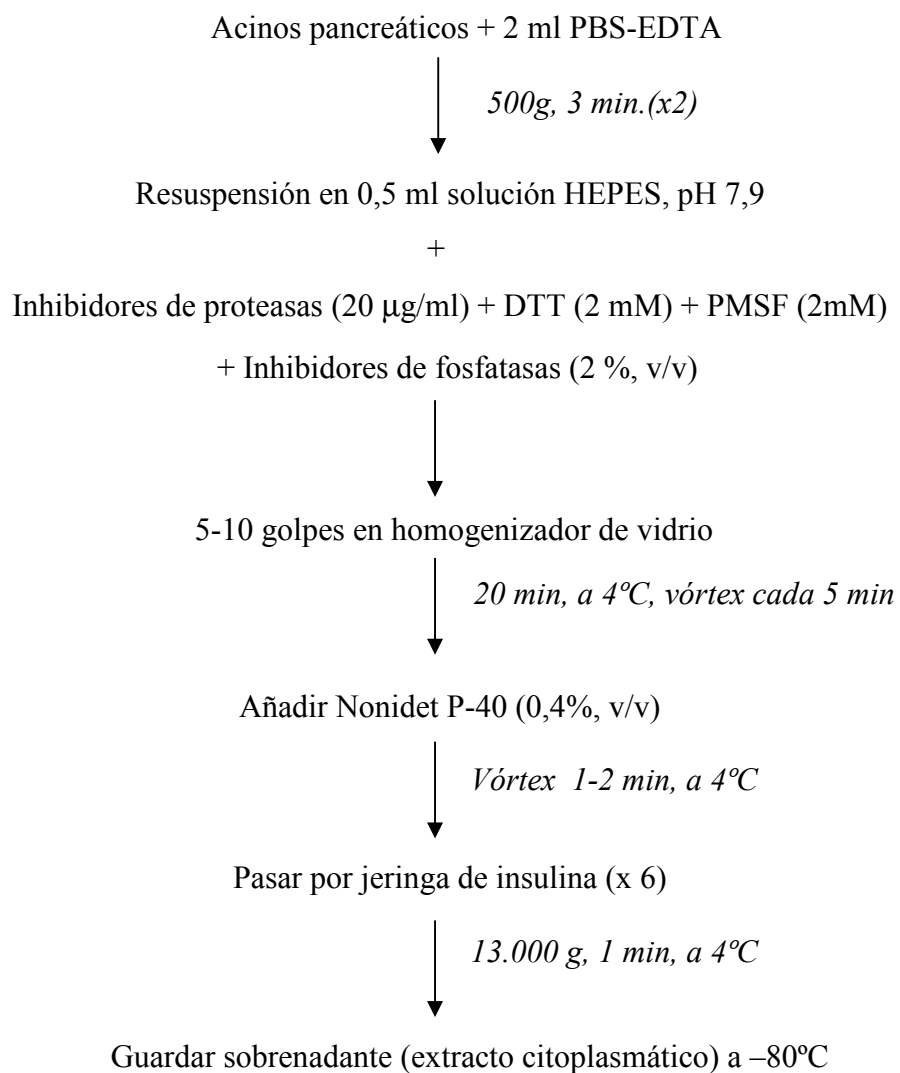
Se ajustó el pH a 7,9 con NaOH 1 N

- Cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma)
- Cocktail de inhibidores de fosfatasas (Sigma)
- Fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF) (Sigma)
- Ditioneitol (DTT) (Sigma)
- Nonidet P40 (Sigma)

El método se especifica en el siguiente esquema:

Esquema 8.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS



3.5.2. ANÁLISIS DE MAPKs.

Se analizaron MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) fosforiladas por la técnica de Western blot a partir de los extractos citoplasmáticos de acinos aislados (método explicado en el apartado 5.1.2).

✓ Reactivos y soluciones.

- Tampón de electroforesis:

- 192 mM Glicina (Merck)
- 25 mM Trizma® base (Sigma)
- 0,1% Lauril sulfato (SDS) (Sigma)

- Tampón de transferencia:

- 192 mM Glicina (Merck)
- 25 mM Trizma® base (Sigma)
- 0,1% Lauril sulfato (SDS) (Sigma)
- 20% Etanol (Panreac)

- Tampón de carga:

- 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 2% Lauril sulfato (SDS) (Sigma)
- 10% Glicerol (Merck)
- 5% Mercaptoetanol (Sigma)
- 0,001% Azul de bromofenol (Merck)

- Geles de Acrilamida 12% (Bio-Rad)

- Membranas de nitrocelulosa 7 x 8 cm (Amersham Biosciences)

- Tampón TBS:

- 20 mM Trizma® base (Sigma)
- 137 mM ClNa (Panreac)

Se ajustó el pH a 7,6 con HCl 37%

- Albúmina sérica bovina (Sigma)

- Solución de bloqueo:
 - TBS
 - 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma)
 - 5% (p/v) Leche en polvo desnatada
- Solución de lavado:
 - TBS
 - 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-p38-MAPK (Thr180/Tyr182) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) obtenido en conejo (Cell Signaling Technology)
- Anticuerpo policlonal primario contra fosfo-SAPK/JNK obtenido en conejo (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling)
- Anticuerpo policlonal primario contra β -actina obtenido en conejo (Cell Signaling)
- Anticuerpo secundario contra conejo (IgG) unido a peroxidasa.
- Anticuerpo secundario contra conejo (IgG)-biotinilado
- Kit de detección Phototope-HRP, (Cell signaling)
- Películas radiográficas HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences)

✓ **Método.**

Proteínas (40 μ g) de extractos citoplasmáticos se separaron en un gel SDS-PAGE al 12% a 25 mA en tampón de electroforesis durante 90 min y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 200 mA. La membrana se conservó a 4°C en un ambiente húmedo hasta su revelado.

Previamente al revelado de la membrana, se bloquearon los puntos de unión inespecífica mediante la incubación durante 1 h en agitación constante, con solución de bloqueo. A continuación la membrana se lavó 1 hora con solución de lavado y se incubó toda la noche en agitación a 4°C con 10 ml del primer antisuero contra β -actina y contra cada una de las fosfoquinasas p-38, ERK y JNK diluidos (1:1000) en tampón TBS conteniendo albúmina sérica bovina 5% (p/v) y Tween 0,1 % (v/v). Después se lavó durante 1h con solución de lavado y agitación vigorosa, para eliminar el anticuerpo no unido. Posteriormente la membrana se incubó a temperatura ambiente con 10 ml de anticuerpo secundario diluido (1: 2000) en solución de bloqueo durante 1 h con agitación. Se añadió el anticuerpo biotinilado para determinar los pesos moleculares de las proteínas. Posteriormente el anticuerpo no unido se eliminó con solución de lavado, mantenido en agitación durante 1 h. Las bandas de fosfo-MAPKs y β -actina (utilizada como referencia) se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL.

3.5.3. ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

3.5.3.1. NF- κ B.

3.5.3.1.A. Análisis de la proteína I κ B α .

Se analizó la degradación de I κ B α por la técnica Western blot a partir de extractos citoplasmáticos (apartado 5.1.2), en las mismas condiciones y con los mismos reactivos que los citados anteriormente para MAPKs, pero en este caso utilizando anticuerpo primario contra I κ B α obtenido en conejo (Cell Signalling).

3.5.3.1.B. Unión NF- κ B/ADN.

Se utilizaron extractos nucleares (apartado 5.1.1) para la determinación de la unión de NF- κ B a ADN mediante un kit comercial (TransAMTM, NF- κ B p65 transcription factor assay kit, Active Motif), basado en la técnica de ELISA. En esta técnica, el NF- κ B se une a una región consenso (5'-GGGACTTTCC-3') del oligonucleótido inmovilizado en la placa de 96 pocillos. El complejo NF- κ B-oligonucleótido inmovilizado se detecta con la ayuda de dos anticuerpos. El primer anticuerpo se une a un epítipo de la subunidad p65 del NF- κ B, accesible sólo cuando el NF- κ B está activado y unido a su ADN diana. El segundo anticuerpo unido a una enzima peroxidasa permite la detección del complejo mediante una reacción colorimétrica cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de p65 presente en la muestra. Los resultados se expresaron como veces de activación respecto al control.

Para evaluar la especificidad, se llevaron a cabo análisis de unión competitiva utilizando un oligonucleótido “salvaje” y un oligonucleótido “mutado”. El oligonucleótido salvaje compitió de manera dosis dependiente con el NF- κ B de la muestra, por el contrario, el oligonucleótido mutado no reconoció la secuencia consenso del oligonucleótido inmovilizado.

3.5.3.2. STAT3.

De igual forma que para NF- κ B, se realizó la determinación de la activación de STAT3 en extractos nucleares (apartado 5.1.1), mediante un kit comercial (TransAMTM, STAT3 transcription factor assay kit, Active Motif) basado en la técnica de ensayo ELISA. En este caso, STAT3 se unió a una región consenso (5'-TTCCCGGAA-3') del oligonucleótido inmovilizado en la placa, y el primer anticuerpo se unió a un epítipo de STAT3 accesible sólo cuando STAT3

está activado y unido a su ADN diana. Los resultados se expresaron también como veces de activación respecto al control.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

Con el fin de estudiar los cambios ocurridos en estudios *in vivo*, se realizaron estudios estadísticos individuales para cada uno de los dos tratamientos. Se aplicó en cada periodo experimental de pancreatitis el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos en los distintos grupos experimentales, para contrastar la igualdad de medias. Posteriormente se aplicó el test de Dunnett, que nos permitió establecer diferencias significativas entre los controles, los grupos con PA no tratados y los grupos de PA tratados con NAC o Dx.

En los estudios *in vitro*, se aplicó también el test de ANOVA seguido del test de Dunnett, con el fin de establecer las posibles diferencias significativas entre el grupo basal, el grupo estimulado con PAAF y el grupo estimulado pre-tratado con NAC o Dx.

En todos los casos se consideraron diferencias significativas para valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

Preámbulo:

A continuación presentamos los resultados en relación a los objetivos planteados, en la forma de las publicaciones a que han dado lugar y añadiendo aquellos otros resultados no incluidos en los artículos publicados. No se incluyen datos preliminares, ni los que se encuentran todavía en fase de ejecución. Aunque cada artículo contiene su propia discusión, hemos incluido una discusión final conjunta con el ánimo de dar una idea global del significado de nuestro estudio.

Estudios IN VIVO.

➤ OBJETIVO 1: Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) sobre la expresión de quimiocinas en páncreas durante pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.

➤ ***OBJETIVO 2: Efecto de la Dexametasona (Dx) sobre la expresión de quimiocinas en páncreas durante pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.***

RESULTADOS NO PUBLICADOS:

1. EFECTO PROFILÁCTICO DE LA DEXAMETASONA EN PA EDEMATOSA Y NECROTIZANTE.

1. PARÁMETROS DE SEVERIDAD.

Como se observa en la Figura 1, la de PA inducida por OBP o por TcNa (3,5%), produjo hemoconcentración, hiperamilasemia y aumento en las concentraciones de IL-1 β en plasma desde los primeros estadios. Todos estos efectos se redujeron significativamente con la administración de Dx 30 min antes de inducir la pancreatitis.

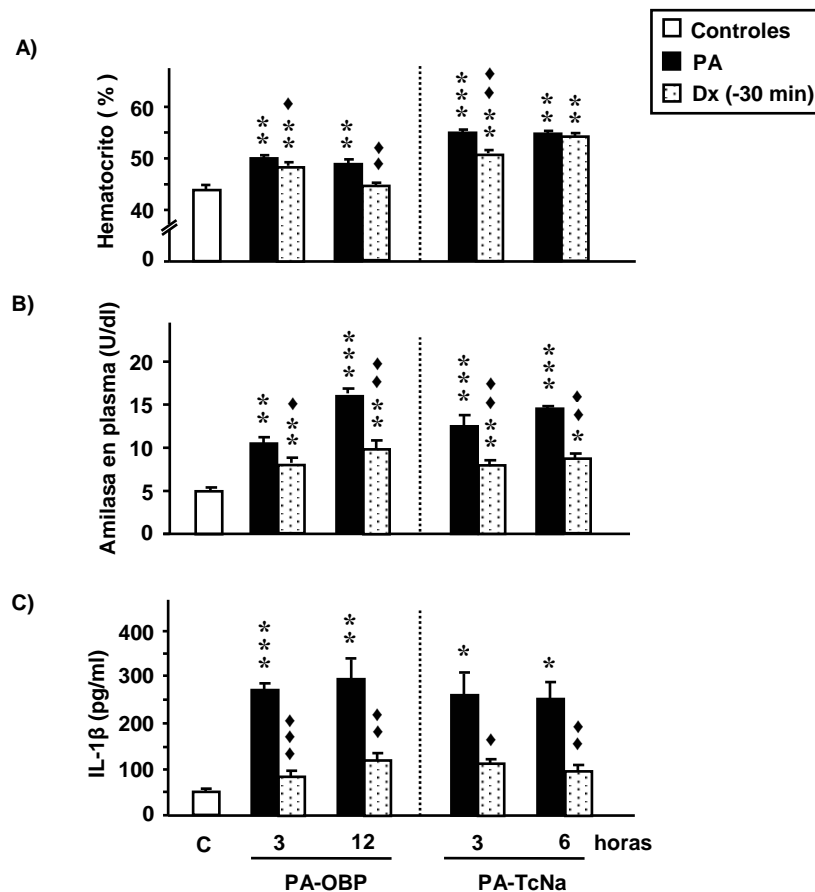


Figura 1. Hematocrito (A), Amilasa en plasma (B), e IL-1 β en plasma (C). Ratas controles (C) y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada grupo. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado ($\diamond p < 0.05$; $\diamond\diamond p < 0.01$; $\diamond\diamond\diamond p < 0.001$).

2. ACTIVACIÓN DE MAPKs.

Como muestra la Figura 2, un aumento significativo en la fosforilación de las MAPKs p38, ERK y JNK, se encontró en células acinares desde las 3 h después de inducir la PA edematosa y necrotizante. Este incremento se redujo significativamente con el tratamiento profiláctico de Dx en PA inducida por OBP, sin embargo en la PA severa inducida por TcNa, la administración profiláctica de Dx resultó ineficaz a la hora de reducir la fosforilación de las distintas kinasas.

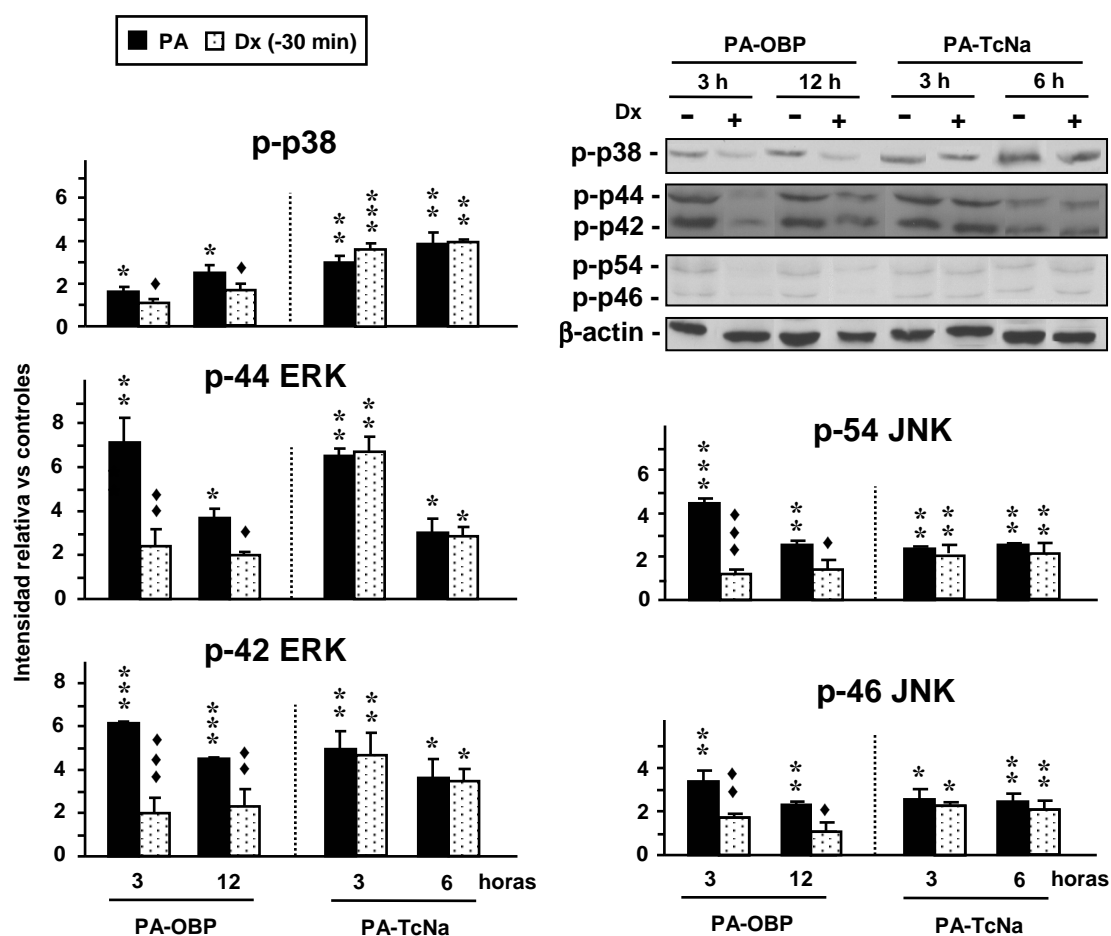


Figura 2. Análisis de la fosforilación de MAPKs en células acinares. Se muestran Western blots representativos de cinco experimentos. Ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. La intensidad relativa de las bandas en cada grupo se valoró por análisis densitométrico. Los resultados se expresaron como veces de aumento respecto al grupo control, usando la β -actina como control de carga. Los valores representan medias \pm SEM. En cada grupo experimental se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado (◆ $p < 0.05$; ◆◆ $p < 0.01$; ◆◆◆ $p < 0.001$).

3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

3.1. Activación de NF- κ B.

La activación de NF- κ B se analizó por la concentración citosólica de I κ B α (A) y por los niveles nucleares de p65 (B). La activación de este factor de transcripción aumentó significativamente 12 h después de la obstrucción biliopancreática y desde las 3 h después de la infusión de TcNa, tal como se deduce por la degradación de la proteína inhibidora I κ B α y por el aumento de p65 nuclear. La administración de Dx 30 min antes de inducir la PA, mantuvo I κ B α a niveles control, e inhibió la unión NF- κ B-ADN significativamente en los dos modelos de PA.

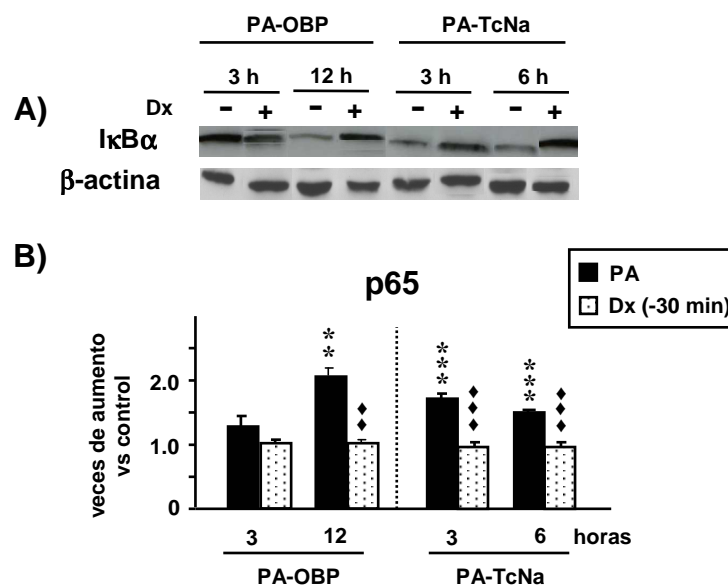


Figura 3. Activación de NF- κ B. Se muestran Western blots representativos de cinco experimentos de I κ B α y β -actina, usada como control de carga (A), y los niveles nucleares de p65 (B), expresados como veces de aumento respecto al grupo control, en valores medios \pm SEM, de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. En cada grupo experimental se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado (♦♦ $p < 0.01$; ♦♦♦ $p < 0.001$).

3.2. Activación de STAT3.

La activación de STAT3 evaluada en extractos nucleares obtenidos de células acinares de los distintos grupos experimentales, indicaron un aumento significativo en los dos modelos de PA, aunque resultó más temprana y más elevada en PA inducida por TcNa. La administración profiláctica de Dx redujo significativamente la activación de STAT3, obteniendo en PA edematosa valores no significativamente diferentes del grupo control.

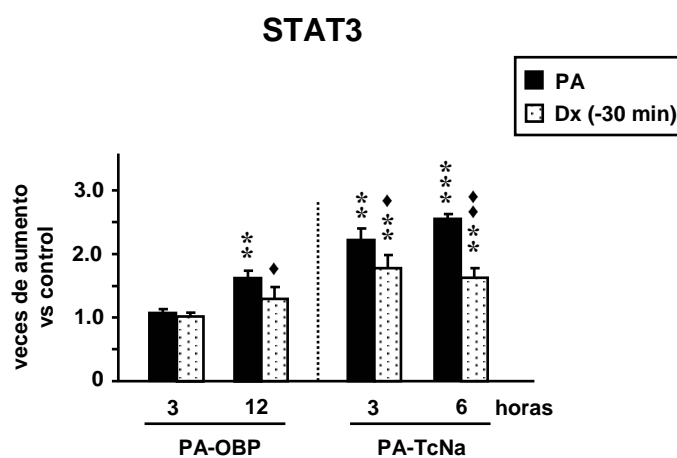


Figura 4. Activación de STAT3. Niveles nucleares de STAT3, expresados como veces de aumento respecto al grupo control, de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. Los valores representan medias \pm SEM de cinco experimentos. En cada grupo experimental se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$; ♦♦ $p < 0.01$).

4. EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS EN CÉLULA ACINAR.

La valoración por RT-PCR de la expresión de ARNm para MCP-1 y CINC en células acinares aisladas de los distintos grupos experimentales (Figura 5), reveló un aumento significativo de ambas quimiocinas desde las 3 h haber inducido PA por obstrucción biliopancreática o por infusión retrógrada de TcNa. La Dx administrada antes de inducir la pancreatitis inhibió significativamente dicha expresión en los dos modelos experimentales.

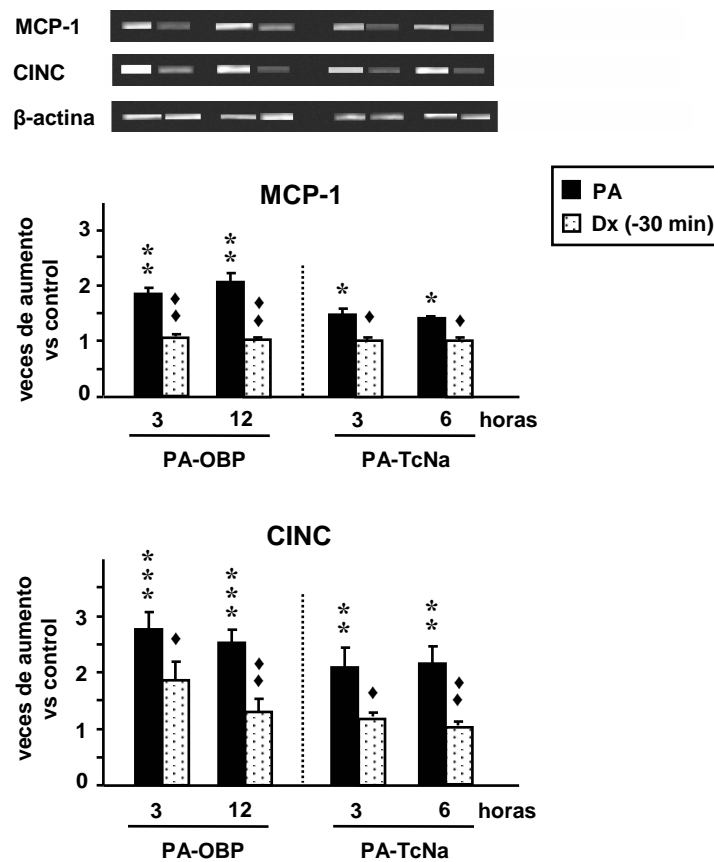


Figura 5. Expresión de ARNm de MCP-1 y CINC en célula acinar. Se muestra RT-PCR representativa y los valores medios \pm SEM, de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. N= 5 en cada grupo. Los resultados se expresaron como veces de aumento vs grupo control de los ratios MCP-1/ β -actina y CINC/ β -actina. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado ($\diamond p < 0.05$; $\diamond\diamond p < 0.01$).

5. EXPRESIÓN QUIMIOCINAS EN PÁNCREAS.

El análisis de la expresión de ARNm de quimiocinas en tejido pancreático valorado por RT-PCR (Figura 6), mostró un significativo aumento, tanto de MCP-1 como de CINC, en los dos modelos de PA. Este aumento se reprimió significativamente por la administración profiláctica de Dx desde estadios tempranos tanto en PA inducida por OBP como en la inducida por TcNa.

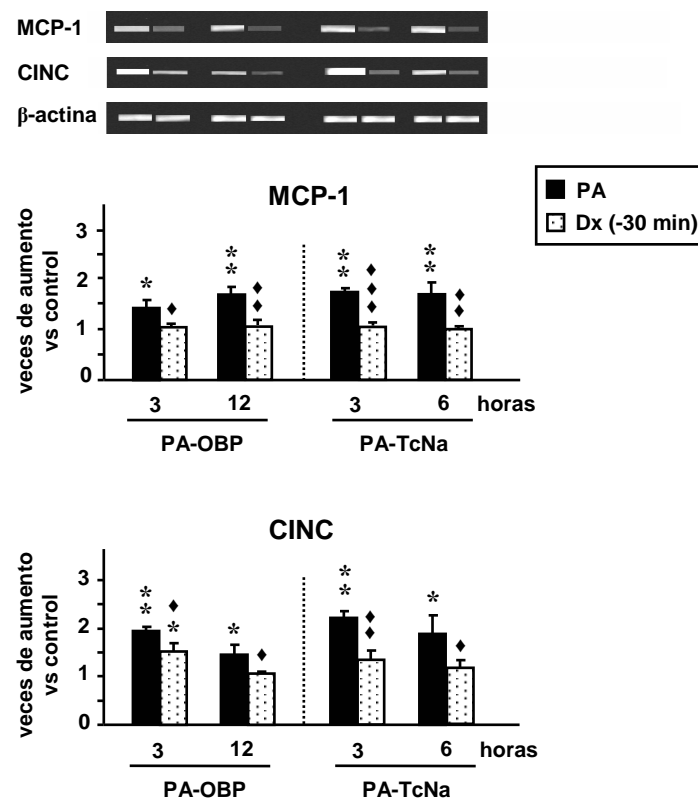


Figura 6. Expresión de ARNm de MCP-1 y CINC en tejido pancreático. Se muestra RT-PCR representativa y los valores medios \pm SEM, de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. N= 5 en cada grupo. Los resultados se expresaron como veces de aumento vs grupo control de los ratios MCP-1/ β -actina y CINC/ β -actina. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$; ♦♦ $p < 0.01$; ♦♦♦ $p < 0.001$).

6. NIVELES DE MCP-1 Y CINC EN PLASMA.

Las concentraciones de MCP-1 y CINC en plasma (Figura 7), aumentaron de forma significativa desde los primeros estadios de la PA en ambos modelos experimentales. La administración profiláctica de Dx redujo significativamente los niveles de quimiocinas en plasma tanto en la PA edematosa como en la PA necrotizante.

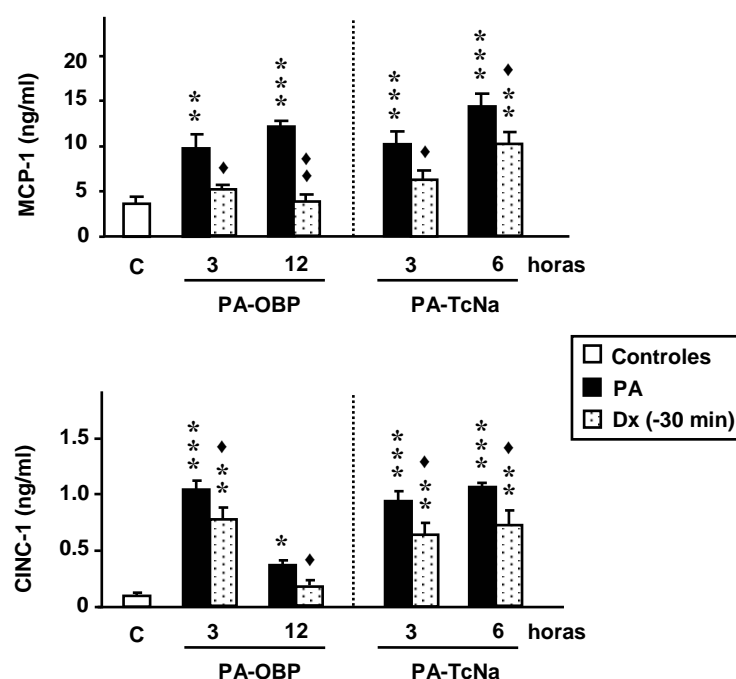


Figura 7. Concentración en plasma de MCP-1 y CINC. Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes de inducir PA. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada grupo. En cada modelo de PA se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$; ♦♦ $p < 0.01$).

RESULTADOS NO PUBLICADOS

2. EFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN PA EDEMATOSA Y NECROTIZANTE.

Tal como se muestra en la Figura 8, la obstrucción biliopancreática y la infusión retrógrada de TcNa provocaron una depleción significativa de los niveles pancreáticos de glutatión (GSH) desde las 3 h después de inducir la PA. La administración profiláctica o terapéutica de Dx no consiguió elevar la concentración de GSH pancreático en ninguno de los dos modelos experimentales de pancreatitis.

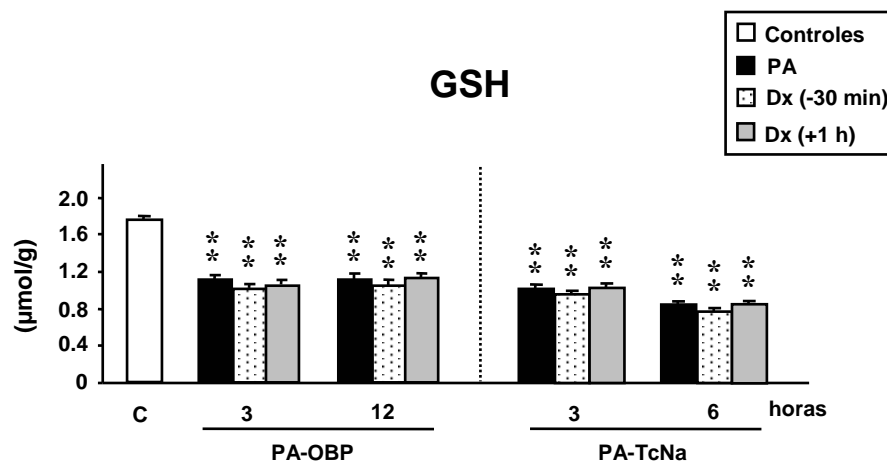


Figura 8. Niveles de Glutación (GSH) en tejido pancreático. Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada periodo experimental. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y entre el grupo de PA tratado con Dx y el no tratado.

➤ ***OBJETIVO 3: Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx) sobre la expresión de moléculas de adhesión en páncreas durante pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.***

- ***3.1. Estudios en PA Edematosa***

- ***3.2. Estudios en PA Necrotizante***

- ***3.1. Estudios en PA inducida por OBP (edematosa):***

- 3.1.A. Efecto de NAC***

- 3.1.B. Efecto de Dx***

➤ **OBJETIVO 4:** *Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx) sobre el daño tisular causado durante la pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.*

Parte de los resultados aparecen publicados en diferentes artículos, pero también se exponen a continuación con los no publicados, para ofrecer una visión conjunta del efecto de ambos tratamientos sobre el daño tisular producido en ambos modelos de PA.

1. DAÑO EN TEJIDO PANCREÁTICO Y HEPÁTICO.

El descenso de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se considera una buena medida del daño celular. Así, se valoró el daño en páncreas e hígado en ambos modelos de pancreatitis. Sólo se encontró un descenso significativo de la actividad LDH en los dos tejidos, a las 6 h de haber inducido PA con TcNa, daño que se redujo significativamente por la administración de NAC y por la administración terapéutica de Dx.

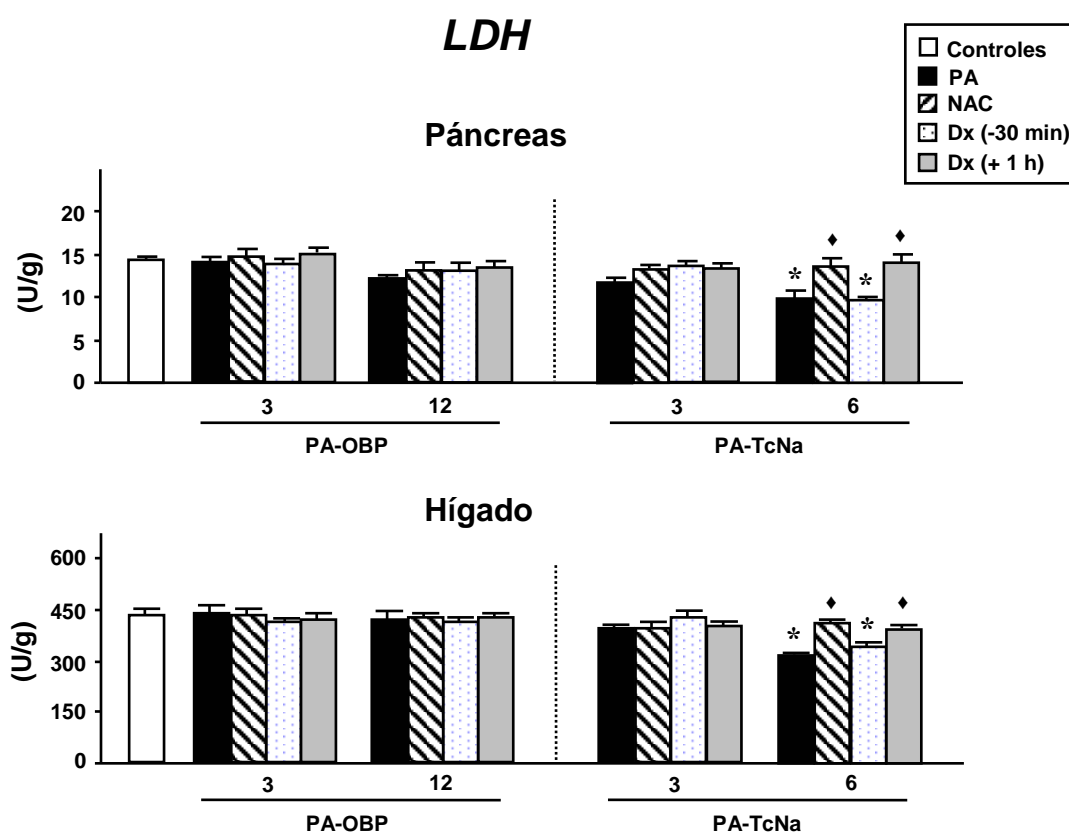


Figura 13. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH) en páncreas e hígado. La actividad LDH se valoró en homogenados de tejido de ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada grupo experimental. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y entre el grupo de PA tratado con NAC o Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$).

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL PÁNCREAS.

En la figura 14 y en la Tabla 1, se muestran las alteraciones morfológicas observadas en secciones de páncreas de ratas con PA inducida por OBP y los efectos de los tratamientos con Dx y NAC. Al cabo de 3 h de inducir la PA, se observaron significativas alteraciones características de la PA tales como edema intersticial, vacuolización e infiltración leucocitaria. Dichas alteraciones resultaron progresivamente mayores al cabo de 12 h de OBP. La administración de NAC redujo significativamente todas las alteraciones morfológicas desde las 3 h de OBP, mientras que la Dx solamente redujo significativamente el edema y la infiltración leucocitaria observados 12 h después de inducir la PA, pero no fue efectivo para disminuir las alteraciones morfológicas del páncreas en estados tempranos de la PA.

En ratas con PA inducida por TcNa (Figura 15) (Tabla 2), se observó un significativo y creciente edema pancreático e infiltración leucocitaria desde las 3 h después de inducir la PA, que se redujo significativamente por la administración profiláctica de Dx y por el tratamiento con NAC. Además, se encontró una significativa vacuolización tanto en ratas no tratadas como en las tratadas con Dx o NAC. Necrosis focal, acompañada de hemorragia, se observó 3 h después de la inducción de la PA que se hizo más extensa a las 6 h. Tanto la administración profiláctica o terapéutica de Dx, como la administración de NAC, redujeron significativamente la necrosis pancreática observada al cabo de 6 h de inducir la PA.

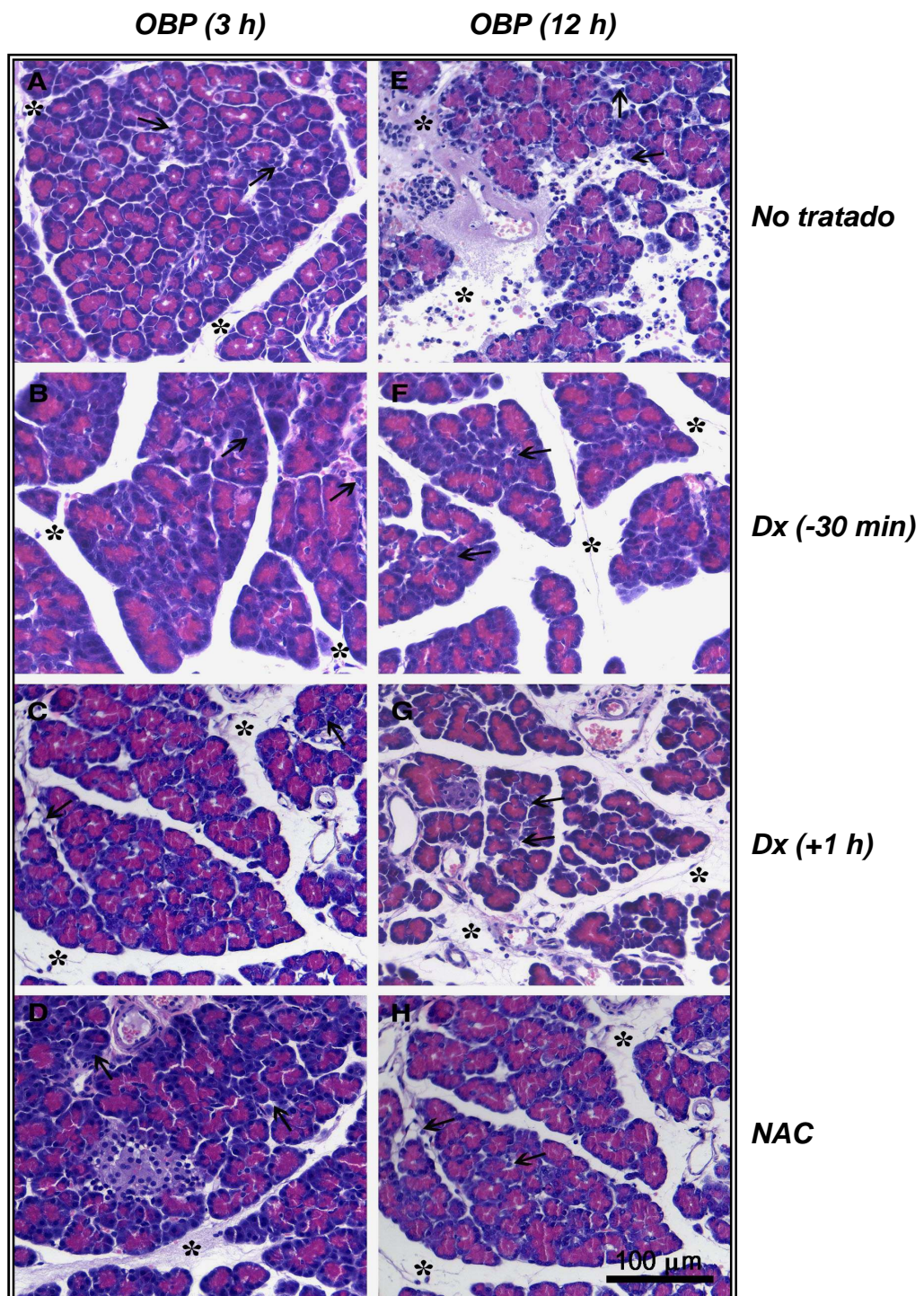


Figura 14. Secciones de páncreas de animales sometidos a pancreatitis aguda (PA) por obstrucción biliopancreática (OBP) durante 3 h (A) y 12 h (E), y de animales tratados con Dexametasona (Dx) 30 min antes de PA [(B) y (F)], 1 hora después de PA [(C) y (G)] o tratados con N-acetilcisteína (NAC) 1 h antes y 1 h después de PA [(D) y (H)]. Tinción hematoxilina-eosina. (★) edema, (→) infiltración de células inflamatorias.

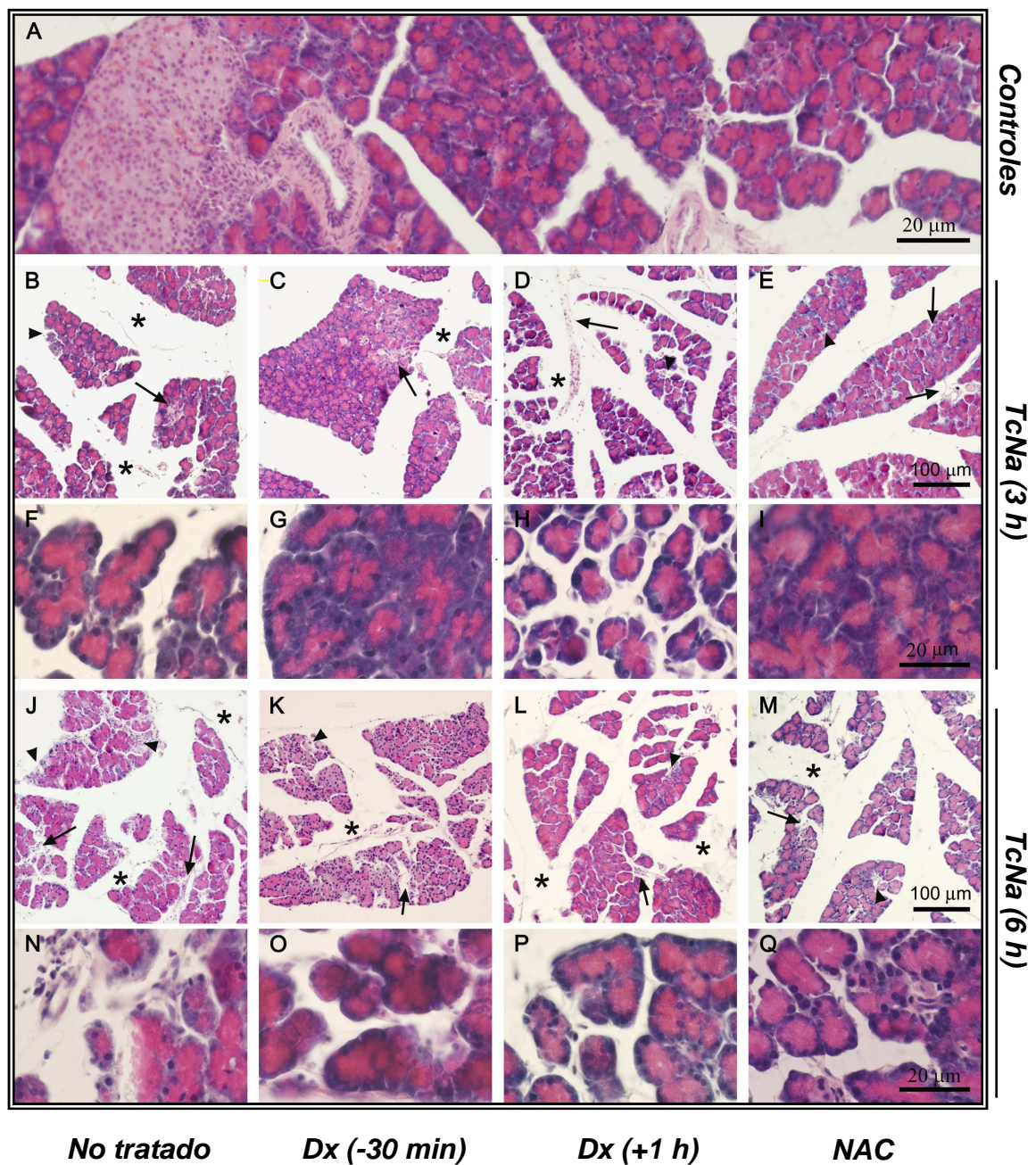


Figura 15. Secciones de páncreas de animales control (A), animales no tratados sometidos a pancreatitis aguda (PA) por infusión retrógrada de TcNa durante 3 h (B/F) y 6 h (J/N), y de animales tratados con Dexametazona (Dx) 30 min antes de PA [(C/G) y (K/O)], 1 h después de PA [(D/H) y (L/P)] o tratados con N-Acetilcisteína (NAC) 1 h antes y 1 h después de PA [(E/I) y (M/Q)]. Tinción hematoxilina-eosina. (★) edema, (→) infiltración de células inflamatorias, (►) necrosis parenquimatosa.

Tabla 1. Evaluación del tejido pancreático en ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por OBP.

	Edema	Infiltración	Vacuolización	Necrosis
Controles	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.04
PA-BPDO (3 h)				
No tratado	0.73 ± 0.12 a (p<0.001)	0.65 ± 0.06 a (p<0.001)	0.8 ± 0.10 a (p<0.001)	0.02 ± 0.05
Dx (-30 min)	0.62 ± 0.04 a (p<0.001)	0.40 ± 0.05 a (p<0.01)	0.65 ± 0.05 a (p<0.001)	0.04 ± 0.03
Dx (+1 h)	0.65 ± 0.06 a (p<0.001)	0.50 ± 0.07 a (p<0.01)	0.75 ± 0.03 a (p<0.001)	0.03 ± 0.06
NAC	0.40 ± 0.08 a (p<0.001) b (p<0.01)	0.35 ± 0.10 a (p<0.001) b (p<0.01)	0.31 ± 0.05 a (p<0.001) b (p<0.001)	0.03 ± 0.07
PA-BPDO (12 h)				
No tratado	1.8 ± 0.03 a (p<0.001)	2.00 ± 0.06 a (p<0.001)	1.00 ± 0.08 a (p<0.001)	0.10 ± 0.05
Dx (-30 min)	1.00 ± 0.12 a (p<0.001) b (p<0.01)	0.75 ± 0.09 a (p<0.001) b (p<0.01)	0.75 ± 0.06 a (p<0.001)	0.04 ± 0.06
Dx (+1 h)	1.3 ± 0.10 a (p<0.001) b (p<0.05)	1.3 ± 0.08 a (p<0.001) b (p<0.05)	0.60 ± 0.05 a (p<0.001)	0.10 ± 0.08
NAC	0.70 ± 0.07 a (p<0.001) b (p<0.01)	0.60 ± 0.11 a (p<0.001) b (p<0.05)	0.30 ± 0.04 a (p<0.001) b (p<0.05)	0.04 ± 0.09

Valoración histológica (0-3) de páncreas para edema, infiltración, vacuolización y necrosis de ratas control y ratas con PA inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) no tratadas o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA, o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC). Los valores representan medias ± SEM. N= 4 en cada grupo experimental. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (a) y entre el grupo de PA tratado con Dx o NAC y el no tratado (b).

Tabla 2. Evaluación del tejido pancreático en ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por TcNa.

	Edema	Infiltración	Vacuolización	Necrosis
Controles	0.11 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.04
PA-TcNa (3 h)				
No tratado	2.00 ± 0.12 a ($p<0.001$)	2.00 ± 0.06 a ($p<0.001$)	0.50 ± 0.10 a ($p<0.001$)	0.50 ± 0.05 a ($p<0.001$)
Dx (-30 min)	1.00 ± 0.04 a,b($p<0.001$)	1.25 ± 0.09 a ($p<0.001$) b ($p<0.01$)	0.25 ± 0.05 a ($p<0.001$)	0.50 ± 0.03 a ($p<0.001$)
Dx (+1 h)	2.50 ± 0.06 a ($p<0.001$)	2.00 ± 0.12 a ($p<0.001$)	0.75 ± 0.03 a ($p<0.001$)	0.50 ± 0.11 a ($p<0.001$)
NAC	1.25 ± 0.07 a ($p<0.001$) b ($p<0.01$)	1.50 ± 0.10 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)	0.25 ± 0.08 a ($p<0.001$)	0.50 ± 0.06 a ($p<0.001$)
PA-TcNa (6 h)				
No tratado	2.50 ± 0.03 a ($p<0.001$)	3.00 ± 0.06 a ($p<0.001$)	0.75 ± 0.02 a ($p<0.001$)	1.80 ± 0.12 a ($p<0.001$)
Dx (-30 min)	2.00 ± 0.12 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)	2.50 ± 0.17 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)	0.75 ± 0.03 a ($p<0.001$)	1.25 ± 0.03 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)
Dx (+1 h)	2.50 ± 0.17 a ($p<0.001$)	3.00 ± 0.12 a ($p<0.001$)	1.00 ± 0.02 a ($p<0.001$)	1.00 ± 0.10 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)
NAC	2.00 ± 0.09 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)	2.50 ± 0.07 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)	0.75 ± 0.04 a ($p<0.001$)	1.00 ± 0.08 a ($p<0.001$) b ($p<0.05$)

Valoración histológica (0-3) de páncreas para edema, infiltración, vacuolización y necrosis de ratas control y ratas con PA inducida por infusión retrógrada de TcNa no tratadas y tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC). Los valores representan medias \pm SEM. N= 4 en cada grupo experimental. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (a) y entre el grupo de PA tratado con Dx o NAC y el no tratado (b).

➤ **OBJETIVO 5:** *Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx) sobre la Respuesta Inflamatoria en leucocitos circulantes durante pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.*

- *5.1. Estudios en PA Edematosa*
- *5.2. Estudios en PA Necrotizante*

- ***5.1. Estudios en PA inducida por OBP (edematosa):***

- 5.1.A. Efecto de NAC***

- 5.1.B. Efecto de Dx***

RESULTADOS NO PUBLICADOS

5.1.A. EFECTO DE NAC EN LEUCOCITOS CIRCULANTES.

1. DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS.

La Figura 16 muestra el número total de leucocitos y el porcentaje relativo de las principales poblaciones leucocitarias. El aumento de leucocitos inducido por la obstrucción biliopancreática desde los primeros estadíos, se redujo significativamente por la administración de NAC. Ratas con PA mostraron una disminución en la población de linfocitos y un aumento en la población de neutrófilos desde las 3 h después de inducir la PA. También se observó un aumento de monocitos a las 12 h de haber inducido la PA. El tratamiento con NAC no pudo evitar ninguna de las alteraciones observadas en la distribución de poblaciones leucocitarias en PA inducida por OBP.

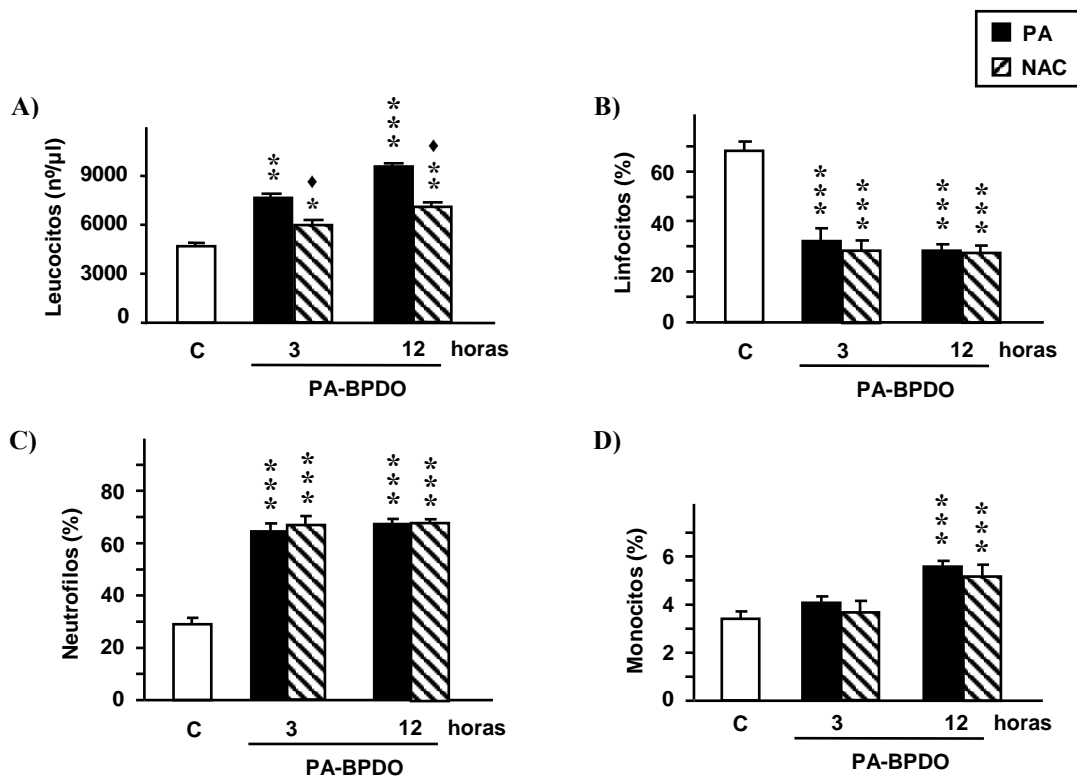


Figura 16. Número total de leucocitos (n°/μl) (A) y distribución relativa de linfocitos (B), neutrófilos (C) y monocitos (D). Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) no tratadas y tratadas con N-Acetilcisteína (NAC). Los valores representan medias \pm SEM. N= 6. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con NAC y el no tratado (♦ $p < 0.05$).

2. EXPRESIÓN DE MCP-1 EN MONOCITOS.

La producción espontánea de MCP-1 en monocitos aumentó significativamente a las 12 h después de la obstrucción biliopancreática. El tratamiento con NAC atenuó este incremento de forma significativa. Bajo estimulación con LPS, la producción de MCP-1 en monocitos aumentó significativamente desde las 3 horas después de inducir la PA, siendo reducida significativamente a lo largo de la PA por la administración de NAC.

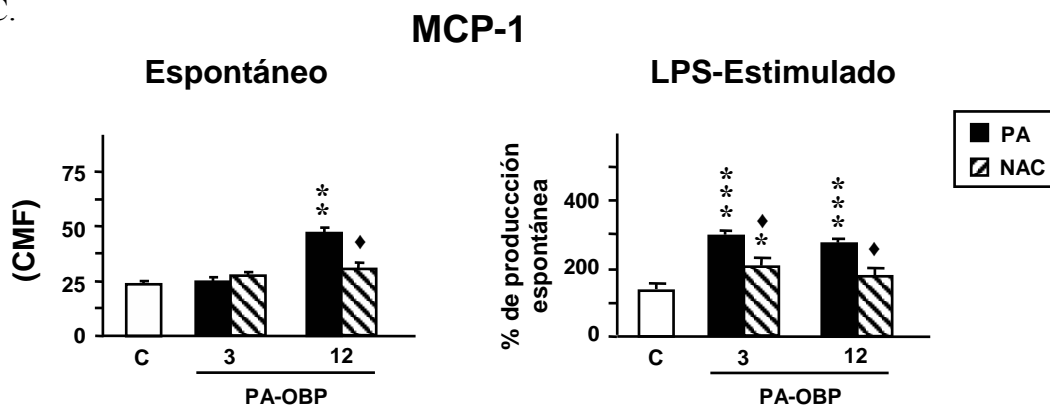


Figura 17. Producción de MCP-1 por monocitos de sangre periférica de forma espontánea y estimulada con LPS. Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) no tratadas y tratadas con N-Acetilcisteína (NAC). La producción espontánea se expresa como canales medios de intensidad de fluorescencia (CMF), unidades arbitrarias de 0 a 10.000, y la producción bajo estimulación con LPS como porcentaje de variación con respecto a la producción espontánea de cada grupo estudiado. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con NAC y el no tratado ($\diamond p < 0.05$).

3. EXPRESIÓN DE CD45 EN LEUCOCITOS.

La expresión de CD45 en leucocitos de sangre periférica descendió significativamente desde los estadios más tempranos de la PA. La administración de NAC no consiguió revertir la expresión de CD45 a valores controles

Tabla 3. Efecto de NAC sobre la expresión de CD45 en leucocitos circulantes.

	OBP 3 h		OBP 12 h	
Controles	–	+ NAC	–	+ NAC
1717.18 \pm 0.73	933.68 \pm 0.43 ($p < 0.001$)	1086.43 \pm 0.65 ($p < 0.001$)	970.57 \pm 0.91 ($p < 0.001$)	1081 \pm 0.52 ($p < 0.001$)

Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) no tratadas y tratadas con N-Acetilcisteína (NAC). Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada grupo. El test ANOVA seguido del test de Dunnett indicó diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.001$).

- ***5.2. Estudios en PA inducida por TcNa (necrotizante):
Efecto de NAC y Dx***

RESULTADOS NO PUBLICADOS

EFFECTO DE NAC y Dx SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD45 EN LEUCOCITOS DURANTE PA NECROTIZANTE.

Los análisis de la expresión de CD45 en leucocitos totales de sangre periférica de ratas con PA inducida por infusión retrógrada de TcNa, reveló un descenso significativo respecto a los controles. Tanto el tratamiento con NAC como con Dx resultaron ineficaces para revertir la expresión de CD45 a valores similares a los obtenidos en leucocitos de ratas controles.

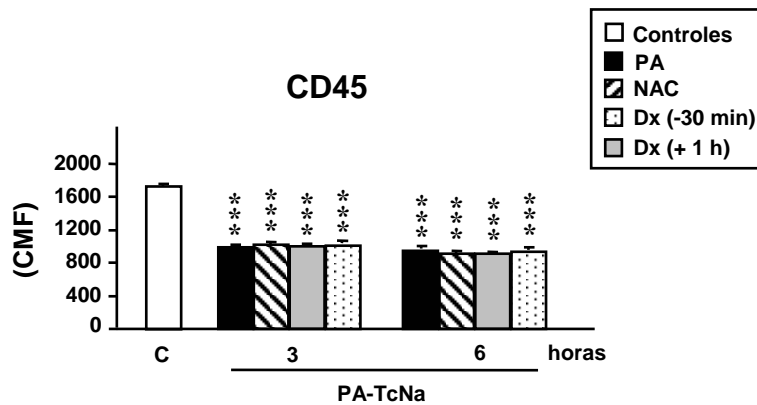


Figura 18. Expresión de CD45 en leucocitos totales. Ratas control y ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa) no tratadas o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. Los resultados se expresaron como canales medios de intensidad de fluorescencia (CMF), unidades arbitrarias de 0 a 10.000. Los valores representan medias \pm SEM. N= 6 en cada grupo experimental. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (***) $p < 0.001$ y entre el grupo de PA tratado con Dx o NAC y el no tratado.

➤ **OBJETIVO 6:** *Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx) sobre la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en pulmón durante pancreatitis aguda (PA) de distinta severidad.*

EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS EN EL PULMÓN.

Según se muestra en la Figura 19, la expresión de ARNm de MCP-1 y CINC en tejido pulmonar, aumentó significativamente desde las 3 h después de inducir la PA por obstrucción biliopancreática o por infusión retrógrada de TcNa. La administración de NAC inhibió de forma significativa la expresión de MCP-1 y CINC en PA media pero no tuvo ningún efecto en la PA necrotizante severa. Los tratamientos con Dx, profiláctico y terapéutico, inhibieron significativamente la expresión de MCP-1 y CINC en ambos modelos de PA.

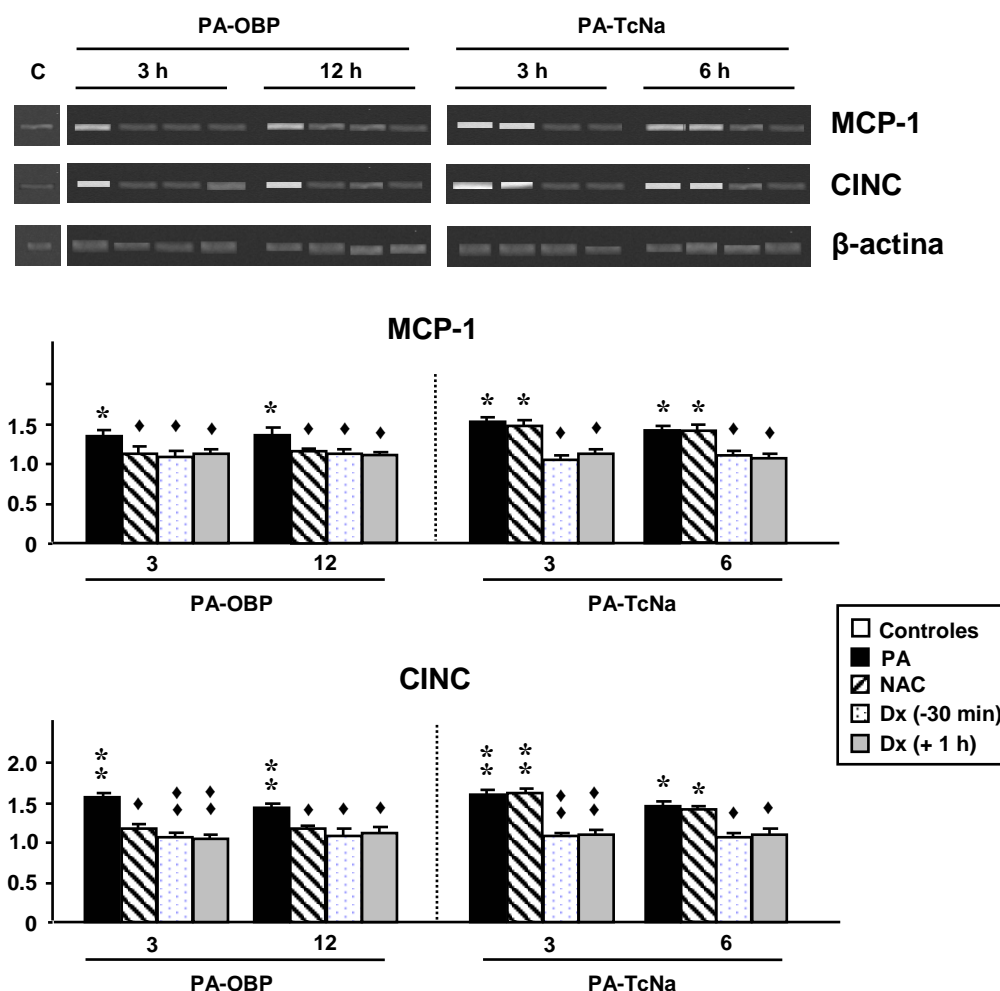


Figura 19. Expresión de ARNm de MCP-1 y CINC en pulmón. Se muestra RT-PCR representativa y los valores medios \pm SEM de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. N= 5 en cada período. Los resultados se expresaron como veces de aumento vs grupo control de ratios MCP-1/β-actina y CINC/β-actina. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y entre el grupo de PA tratado con NAC o Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$; ♦♦ $p < 0.01$).

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN EL PULMÓN.

La valoración por RT-PCR de la expresión de las moléculas de ARNm de las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina en pulmón durante PA edematosa y necrotizante (Figura 20), reveló un aumento significativo para ambas moléculas desde primeros estadios de la enfermedad. El tratamiento con NAC consiguió reducir la expresión de ICAM-1 sólo en la PA edematosa en los estadios iniciales (3 h después de la obstrucción). La expresión de P-selectina sólo se redujo por la administración de NAC en la PA de mediana severidad, resultando por tanto ineficaz para reducir la expresión de ambas moléculas en la PA necrotizante. Por otra parte, la administración de Dx inhibió la expresión de ICAM-1 y redujo significativamente, pero no inhibió, la expresión de P-selectina en los dos modelos de PA.

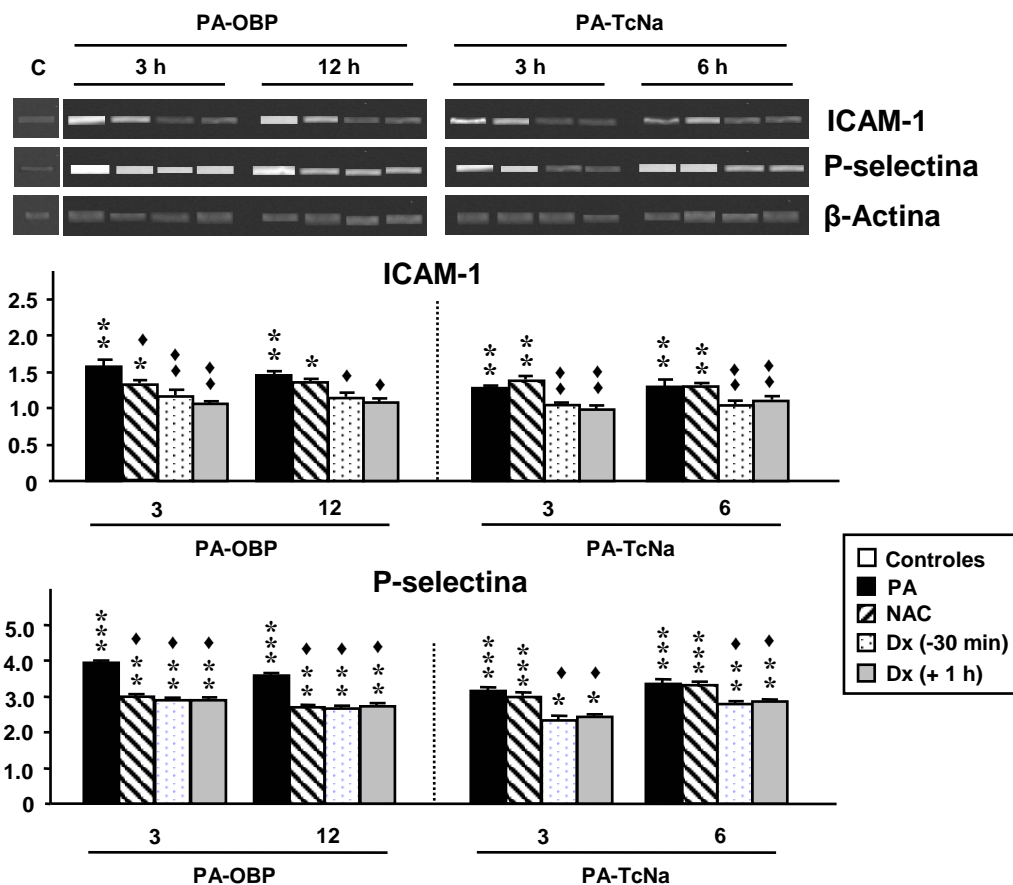


Figura 20. Expresión de ARNm de ICAM-1 y P-selectina en pulmón. Se muestra RT-PCR representativa y los valores medios \pm SEM de ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa), no tratadas o tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. N= 5 en cada período. Los resultados se expresaron como veces de aumento vs grupo control de ratios ICAM-1/ β -actina y P-selectina/ β -actina. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y entre el grupo de PA tratado con NAC o Dx y el no tratado (♦ $p < 0.05$; ♦♦ $p < 0.01$).

Tablas resumen:

A modo de resumen y para tener una visión conjunta que facilite la comparación de la eficacia del tratamiento antioxidante versus el tratamiento anti-inflamatorio, se exponen a continuación dos Tablas que reflejan los parámetros indicativos del grado de severidad de la enfermedad (Tabal 4) y la modulación de la respuesta inflamatoria (Tabla 5) en ambos modelos de PA como consecuencia del tratamiento con NAC o con la administración profiláctica o terapéutica de la Dx.

Tabla 4. Parámetros de severidad. Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx).

			HEMATOCRITO	% FLUIDO PÁNCREAS	AMILASA PLASMA	GSH	MPO PÁNCREAS	MPO PULMÓN	IL-6 PLASMA	IL-1 β PLASMA	EDEMA	INFILTRACIÓN	VACUOLIZACIÓN	NECROSIS	LDH PÁNCREAS	LDH HÍGADO	LEUCOCITOSIS	% LINFOCITOS	% NEUTRÓFILOS	% MONOCITOS
PA-OBP	3 h	NAC	↓	=	↓	↑	—	—	=	↓	↓	↓	↓	—	—	—	↓	=	=	—
		Dx (-30 min)	↓	=	↓	=	—	—	↓	↓	=	=	=	—	—	—	↓	=	=	—
		Dx (+1 h)	↓	=	↓	=	—	—	↓	↓	=	=	=	—	—	—	↓	=	=	—
	12 h	NAC	=	↓	↓	=	↓	↓	=	↓	↓	↓	↓	—	—	—	↓	=	=	=
		Dx (-30 min)	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	↓	↓	=	—	—	—	↓	=	=	↓
		Dx (+1 h)	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	↓	↓	=	—	—	—	↓	=	=	↓
PA-TcNa (3,5 %)	3 h	NAC	↓	↓	↓	=	=	=	=	↓	↓	↓	=	=	—	—	↓	=	=	=
		Dx (-30 min)	↓	↓	↓	=	=	=	=	↓	↓	↓	=	=	—	—	↓	=	=	↓
		Dx (+1 h)	↓	=	↓	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	—	—	↓	=	=	↓
	6 h	NAC	=	↓	↓	=	=	=	=	↓	↓	↓	=	↓	↑	↑	↓	=	=	=
		Dx (-30 min)	=	↓	↓	=	=	=	=	↓	↓	↓	=	↓	=	=	↓	=	=	↓
		Dx (+1 h)	=	=	↓	=	=	=	=	↓	=	=	=	↓	↑	↑	↓	=	=	↓

Ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de 3,5 % de taurocolato sódico (TcNa), tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. (—) Sin diferencia significativa entre PA y control; (=) Sin efecto; (↓) Reducción significativa vs PA; (↑) Aumento significativo vs PA.

Tabla 5. Respuesta Inflamatoria. Efecto de N-Acetilcisteína (NAC) y Dexametasona (Dx).

			<i>P38-MAPK Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</i>			<i>CÉLULA ACINAR</i>			<i>PÁNCREAS</i>			<i>PLASMA</i>			<i>LEUCOCITOS</i>			<i>PULMÓN</i>		
			<i>P38-MAPK</i>	<i>ERK/JNK</i>	<i>NF-κB / STA3</i>	<i>MCP-1 / CINC</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>P-SELECTINA</i>	<i>MCP-1 / CINC</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>P-SELECTINA</i>	<i>MCP-1</i>	<i>CINC</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>MCP-1/TNF-α</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>CD45</i>	<i>MCP-1 / CINC</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>P-SELECTINA</i>
PA-OBP	3 h	NAC	—		—	↓	=	NE	=	=	NE	=	=	=	↓	—	=	↓	↓	↓
		Dx (-30 min)	—	↓	—	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	=	↓	↓	↓
		Dx (+1 h)	—	↓	—	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	↑	↓	↓	↓
	12 h	NAC	↓		↓	↓	—	NE	=	=	NE	=	=	=	↓	—	=	↓	=	↓
		Dx (-30 min)	↓	↓	↓	↓	—	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	=	↓	↓	↓
		Dx (+1 h)	↓	↓	↓	↓	—	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	↑	↓	↓	↓
PA-TcNa (3,5 %)	3 h	NAC	=		=	=	=	NE	=	=	NE	=	=	=	↓	—	=	=	=	=
		Dx (-30 min)	=	=	↓	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	=	↓	↓	↓
		Dx (+1 h)	=	↓	↓	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	—	=	↓	↓	↓
	6 h	NAC	=		=	=	=	NE	=	=	NE	=	=	=	↓	=	=	=	=	=
		Dx (-30 min)	=	=	↓	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	↓	=	↓	=	=	↓	↓	↓
		Dx (+1 h)	=	↓	↓	↓	↓	NE	↓	↓	NE	↓	=	=	↓	=	=	↓	↓	↓

Ratas con pancreatitis aguda (PA) inducida por obstrucción biliopancreática (OBP) o infusión retrógrada de 3,5 % de taurocolato sódico (TcNa), tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) o tratadas con Dexametasona (Dx) 30 min antes o 1 h después de inducir PA. (—) Sin diferencia significativa entre PA y control; (NE) No expresión; (=) Sin efecto; (↓) Reducción significativa vs PA; (↑) Aumento significativo vs PA.

Estudios IN VITRO.

➤ OBJETIVO 7: Estudios in vitro de la respuesta inflamatoria de la célula acinar bajo estimulación con PAAF.

RESULTADOS NO PUBLICADOS

EXPRESIÓN DE ICAM-1.

Como muestra la Figura 21, la expresión de ARNm de ICAM-1 en células acinares bajo condiciones de estimulación con fluido ascítico asociado a pancreatitis (PAAF, 20% v/v) aumentó dos veces respecto a la expresión de ICAM-1 en condiciones basales (ausencia de PAAF) de acuerdo con el ratio ICAM-1/ β -actina. La administración de NAC no consiguió reducir la expresión de ICAM-1 inducida por PAAF, y tampoco mostró ningún efecto sobre las células acinares no estimuladas.

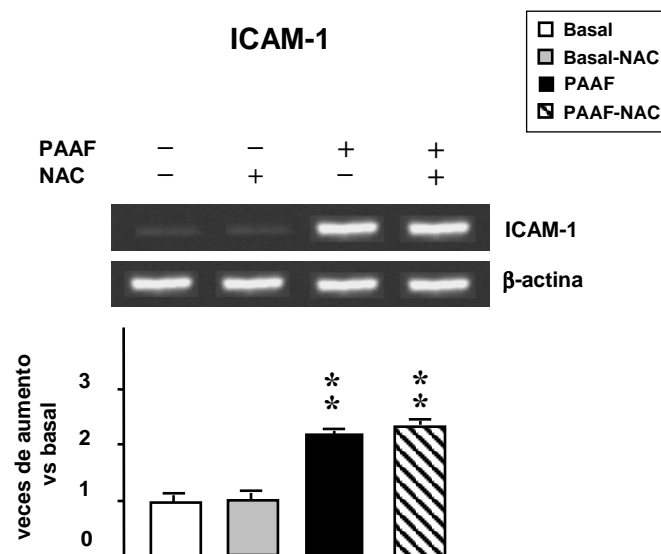


Figura 21. Expresión de ARNm de ICAM-1 en células acinares en condiciones basales o bajo estimulación con PAAF (20% v/v). Se muestra RT-PCR representativa y los valores medios \pm SEM de cinco experimentos. Los resultados se expresaron como veces de aumento vs basal de ratios ICAM-1/ β -actina. Se aplicó el test ANOVA seguido del test de Dunnett para identificar las diferencias significativas respecto a células no estimuladas (condiciones basales) (** $p < 0.01$) y respecto a las células estimuladas con PAAF tratadas con N-Acetilcisteína (NAC) y no tratadas.

5. Discusión

5.1. SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Desde la fase inicial de la PA, tiene lugar una sobreproducción de ROS, que directamente inducen daños oxidativos en el páncreas, e indirectamente contribuyen en la síntesis de factores inflamatorios que participan en la extensión local y sistémica de la respuesta inflamatoria.

Para estudiar los efectos que tratamientos antioxidantes y anti-inflamatorios tienen sobre el patrón y los mecanismos moleculares de expresión de estos mediadores inflamatorios, se han utilizado dos modelos experimentales que inducen PA de distinto grado de severidad. Como modelo de PA moderada, elegimos la obstrucción biliopancreática (OBP) en rata, un modelo que induce PA de tipo edematoso y con el que nuestro grupo de investigación tiene una dilatada experiencia (de Dios y cols., 2002a, 2006; Sevillano y cols., 2003a,b; Ramudo y cols., 2005b). Por otra parte resulta un modelo atractivo, por cuanto simula la etiología más frecuente de la PA humana (Pandol y cols., 2007). Como modelo de PA severa, se utilizó la perfusión retrógrada de taurocolato sódico (TcNa) en el conducto biliopancreático, un modelo descrito por Aho y colaboradores (Aho y cols., 1984) y bien estandarizado experimentalmente como modelo de PA necrotizante. Diferentes concentraciones de TcNa entre el 3 % y el 5 % se han utilizado para inducir PA en distintas especies animales (Poch y cols., 1999; Vaquero y cols., 2001; Liu y cols., 2003; Shi y cols., 2006). Después de estudios preliminares decidimos elegir 3,5 % de TcNa, una concentración que nos permitió llevar a cabo un estudio de las alteraciones que progresivamente se desarrollan en los primeros estadios de la PA. Concentraciones de TcNa del 5 % resultaron excesivamente lesivas para las células pancreáticas desde el momento de su perfusión.

El intenso estrés oxidativo que tiene lugar durante la PA (Sanfey y cols., 1984; Schoenberg y cols., 1994; Braganza y cols., 1995) y los resultados favorables obtenidos con el uso de antioxidantes sobre la evolución de la enfermedad (Niederau y cols., 1992; Czako y cols., 1998; Demols y cols., 2000), son aspectos ampliamente aceptados. Como tratamiento antioxidante elegimos para nuestro estudio N-Acetilcisteína (NAC), dadas sus buenas propiedades anti-inflamatorias (Blackwell y cols., 1996; Cotgreave., 1997; Kim y cols., 2000; Ramudo y cols., 2005b) y antioxidantes (Cotgreave, 1997; Sevillano y cols., 2003 a,b), así como por los escasos efectos secundarios observados en clínica derivados de su aplicación. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación aplicando distintos protocolos de administración (vía administración y

posología), revelaron una mayor efectividad de NAC administrada por vía intraperitoneal, 1 h antes y 1 h después de inducir la PA a dosis de 50 mg/kg en cada inyección, ya que con dosis menores se observaron menos efectos beneficiosos y dosis más altas no resultaron más eficaces (Sevillano y cols., 2003b).

Como tratamiento anti-inflamatorio se eligió la Dexametasona (Dx), glucocorticoide sintético de gran poder antiinflamatorio e inmunosupresor (Auphan y cols., 1995; Barnes, 1998). La efectividad de los glucocorticoides en el tratamiento de la PA es objeto de disputa. El beneficio de los corticosteroides en PA humana, se reportó por primera vez en 1952 (Stephenson y cols., 1952). Posteriormente, se han realizado estudios en distintos modelos experimentales de PA *in vivo* (Monto y cols., 1983; Lium y cols., 1987; Gómez y cols., 1989; Zhang y cols., 2007) y en modelos *ex vivo* sobre páncreas de perro perfundido (Kimura y cols., 1980), habiéndose reportado efectos contradictorios en cuanto a su eficacia para reducir los síntomas de la PA.

En nuestro estudio, la Dx se administró vía intramuscular, dada la rápida metabolización que caracteriza a este GC, y a una dosis de 1 mg/kg, como aproximación a un potencial uso en clínica, dado que es una dosis equivalente a la utilizada en humanos (Wang y cols., 2004). La administración profiláctica de la Dx, lejos de tener una aplicación clínica directa, se llevó a cabo con el fin de poder bloquear la cascada de mecanismos que tienen lugar desde las primeras horas de producirse la PA, permitiéndonos estudiar su mecanismo de acción y efecto en la fisiopatología de la enfermedad. Por otro lado, la administración de Dx 1 h después de inducir la PA, tiene como objetivo el diseño de una estrategia terapéutica, a fin de reconocer su papel paliativo en el desarrollo de la enfermedad, al interferir en mecanismos fisiopatológicos ya desencadenados.

5.2. SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

En nuestro estudio hemos analizado el patrón de expresión de dos quimiocinas con efectos quimioatrayentes específicos sobre distintos tipos de leucocitos, MCP-1 (sobre monocitos) y CINC (sobre neutrófilos). Por otra parte, hemos elegido dos moléculas de adhesión que actúan a diferentes niveles en el proceso de interacción leucocitos-célula endotelial vascular previo a la trans migración: P-selectina (capturación y “rolling”) e ICAM-1 (firme adhesión).

En respuesta a estímulos inflamatorios, células acinares pancreáticas, han demostrado producir citocinas por mecanismos sensibles al estado redox de la célula (Blinman y cols., 2000; Ramudo y cols., 2005a,b; Ramnath y cols., 2006, 2007 y 2008). En base a ello, nos pareció de gran interés plantear nuestro estudio en pancreatitis agudas de diferente severidad, que demostraron desarrollar en el páncreas diferente grado de estrés oxidativo, tal como lo demuestran los resultados obtenidos con el tratamiento con NAC, que consiguió revertir la depleción del glutatión en los estadios tempranos de la PA inducida por OBP, mientras que resultó ineficaz en la PA inducida por TcNa. La comparación de los resultados en ambos modelos de PA nos permitirá deducir las rutas de señalización activadas por mecanismos oxidativos.

Sobreexpresión acinar de quimiocinas mediada por la activación de MAPKs (Blinman y cols., 2000; Ramnath y cols., 2007; Yubero 2009a,c) y de los factores de transcripción NF- κ B (Ramnath y cols., 2006; Samuel y cols., 2006) y AP-1 (Ramnath y cols., 2008) ha sido reportado por nuestro grupo y por otros autores. Activación de STAT3 en PA experimental ha descrito en células alveolares de ratas con PA inducida por TcNa (Zhong y cols., 2009) y en homogenados de tejido pancreático en PA inducida por ceruleína en el ratón (Gironella y cols., 2007). Sin embargo, nuestro estudio muestra por primera vez la sobreexpresión de quimiocinas en célula acinar paralelamente a la activación del factor de transcripción STAT3, en dos modelos de PA de diferente severidad (Yubero y cols., 2009a,c) y en experimentos *in vitro* sobre células acinares expuestas a PAAF (Ramudo y cols., 2009).

NF- κ B es un factor pleiotrópico que puede ser activado por ROS (Schreck y cols., 1992) vía activación de MAPKs (Ramnath y cols., 2008). Por otra parte los ROS activan la ruta de JAK/STAT (Simon y cols., 1998) previa inhibición de fosfatasa, permitiendo así la fosforilación de proteínas JAK-STAT que precede a la activación del factor STAT. Los resultados obtenidos con NAC, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, indicaron que la expresión de quimiocinas en célula acinar es altamente dependiente de la activación de las rutas de señalización sensibles al estado redox de la célula: p38-MAPK, NF κ -B y STAT-3, ya que cuando la generación de ROS excedió la capacidad antioxidante de NAC, la sobreexpresión de quimiocinas y mecanismos moleculares implicados no pudieron ser reprimidos. En consecuencia, sólo en PA edematosa inducida por OBP, el tratamiento con NAC resultó eficaz para prevenir la expresión de quimiocinas en células acinares. Además, ya que no sólo las quimiocinas, sino que también las propias moléculas de ROS actúan como poderosos agentes

quimioatrayentes, la capacidad antioxidante del tratamiento con NAC resultó más eficaz para reducir la infiltración leucocitaria en PA edematosa que en PA necrotizante.

A pesar de reprimir la expresión de MCP-1 y CINC en células acinares de ratas con PA inducida por OBP, el tratamiento con NAC no redujo la expresión de quimiocinas en tejido pancreático en ninguno de los dos modelos de PA. Este resultado sugiere que además de las células acinares, otras células residentes en el páncreas capaces de producir quimiocinas, tales como células endoteliales de origen vascular (Lee y cols., 2003; Mordelet y cols., 2007), células estrelladas (Masamune, 2006; Michalski y cols., 2007) y leucocitos infiltrados (Gourmala y cols., 1997; Sun J y cols., 2007), producen MCP-1 y CINC durante la PA por mecanismos no sensibles al estado redox celular, puesto que el patrón de expresión de MCP-1 y CINC en tejido pancreático de los animales con PA tratados y no tratados con NAC se corresponde con el perfil de los niveles de quimiocinas en plasma, todo hace suponer que las quimiocinas plasmáticas proceden mayoritariamente de células no acinares pancreáticas.

Dado que la administración de NAC no redujo las concentraciones plasmáticas de IL-6 ni en PA edematosa ni en PA necrotizante, sugerimos que además de citocinas locales producidas por células acinares desde estadios iniciales de la PA (Blindan y cols., 2000; Ramudo y cols., 2005b), citocinas circulantes podrían actuar como estimulantes de la expresión de quimiocinas en células no acinares del páncreas. Esta hipótesis está justificada por el hecho de que además de ROS, las citocinas han demostrado ser factores claves en la estimulación de NF- κ B y STAT3 en diferentes tipos celulares (Hohmann y cols., 1999; Takeda y cols., 2000). Los resultados obtenidos con el tratamiento con Dx confirman esta hipótesis, ya que tanto su administración profiláctica como terapéutica en ambas PA, y en los estudios *in vitro*, demostraron represión de la expresión de quimiocinas tanto en célula acinar como en tejido pancreático, en paralelo con una reducción de la citoquinemia y con la inhibición de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3.

Los glucocorticoides (GC) se consideran agentes anti-inflamatorios por actuar directamente a nivel transcripcional para reprimir genes que codifican factores inflamatorios. Dos mecanismos se han reportado para explicar el efecto inhibitor de los GCs sobre la activación de NF- κ B: transrepresión, por el que el complejo GC-receptor interacciona con p65, interfiriendo así en la unión con el ADN (Scheinman y cols., 1995), y transactivación, que conlleva la síntesis de la proteína inhibidora I κ B α (Auphan y cols., 1995). Los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, revelaron

que la Dx ejerció un efecto de transactivación, estimulando la síntesis de I κ B α y así manteniendo secuestrado en el citoplasma el complejo NF- κ B. El hecho de que valores controles de p65 se encontraran tras el tratamiento con Dx, es una clara evidencia del fallo en la translocación de NF- κ B al núcleo.

Efectos inhibidores de la Dx sobre la activación de miembros de la familia STAT se han descrito en macrófagos (Hu y cols., 2003) y queratinocitos (Stojadinovic y cols., 2007) estimulados con citocinas. Nuestros resultados mostraron que la activación de STAT3 en célula acinar es especialmente sensible a la acción inhibidora de la Dx y podría ser considerado este factor de transcripción como una diana terapéutica de intervención en PA, asentando un nuevo mecanismo de acción anti-inflamatoria de los glucocorticoides.

MAPKs son proteínas activadas por estrés que se han asociado ampliamente con las rutas de señalización implicadas en la síntesis de factores inflamatorios. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que en la célula acinar las MAPKs no juegan un papel clave en la expresión de genes inflamatorios mediada por la activación de NF- κ B y STAT3. Dx reprimió la expresión de quimiocinas *in vitro* y de quimiocinas y moléculas de adhesión *in vivo* sin reducir la fosforilación de p38-MAPK. Las otras MAPKs analizadas (ERK y JNK) se mostraron más sensibles a la acción de la Dx, observándose una inhibición de las mismas en PA edematosa y necrotizante en respuesta a un post-tratamiento con Dx. Sin embargo, la administración profiláctica de Dx no redujo la actividad de ninguna MAPK en PA inducida por TcNa, aunque sí redujo significativamente la activación de NF- κ B y STAT3 y la expresión de factores inflamatorios; una evidencia de que el efecto anti-inflamatorio de la Dx cursa por una ruta independiente de MAPK.

La Dx, a pesar de inhibir la expresión pancreática de quimiocinas y moléculas de adhesión en los dos modelos de PA, solamente resultó realmente eficaz para inhibir la infiltración leucocitaria en páncreas de ratas con PA inducida por OBP. A ello podría contribuir el hecho de que el intenso estrés oxidativo desarrollado en la glándula de ratas con PA inducida por TcNa, pueda reducir la efectividad de la Dx para reprimir el reclutamiento de leucocitos, dado el poderoso efecto quimioatrayente de los ROS (Poch y cols., 1999).

Nuestros resultados mostraron una expresión diferencial en el páncreas de las dos moléculas de adhesión estudiadas. En ninguno de los dos modelos de PA observamos expresión de P-selectina, ni en célula acinar en tejido pancreático. No hay

referencias bibliográficas de este dato en PA edematosa. En estadios tempranos de PA inducida por TcNa al 5 %, se ha descrito expresión de P-selectina en células endoteliales vasculares (Folch E y cols., 2000; Telek G y cols., 2001). Cuando el TcNa fue perfundido al 3,5 %, como en nuestro estudio, sólo se detectó expresión de P-selectina en tejido pancreático al cabo de 6 h en la cabeza del páncreas, pero no en la cola (Xiping y cols., 2010). La discrepancia con nuestros resultados, que no revelaron expresión de P-selectina en PA-TcNa de 6 h, podría deberse a que para nuestros análisis se recogió homogenado de ambas zonas del páncreas.

Por el contrario, en ambos modelos de PA, aunque con diferente perfil de expresión, se observó un aumento de ICAM-1 en páncreas, contribuyendo a ello en gran medida la célula acinar. El tratamiento con NAC, resultó totalmente ineficaz para reducir la expresión de ICAM-1 en tejido pancreático, tanto en célula acinar como en no acinar. Este mismo resultado lo observamos también en estudios *in vitro* con células acinares estimuladas con PAAF. La administración de NAC tampoco redujo significativamente la sobreexpresión de ICAM-1 ocurrida en leucocitos circulantes de PA severa, ni la observada en ambos modelos de pancreatitis en tejido pulmonar.

Comparando estos resultados con los obtenidos en quimiocinas, cabe concluir que la expresión de los distintos factores inflamatorios están sujetos a una regulación diferencial y aquellos mecanismos implicados en la expresión de ICAM-1 son independientes del estado redox de la célula.

Estudios llevados a cabo por otros autores (Rothlein y cols., 1988; Frossard y cols., 1999) revelaron que, mediado en parte por la activación de NF- κ B, ICAM-1 se expresa en células endoteliales en respuesta a citocinas. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los factores inflamatorios locales y/o circulantes podrían actuar prioritariamente como estimulantes de la expresión de ICAM-1, ya que los tratamientos con Dx, con efecto inmunosupresor, reprimieron la expresión tisular de esta molécula de adhesión.

ICAM-1 se puede liberar a plasma por un mecanismo regulado dependiente de TNF- α (Melis y cols., 2003). Teniendo en cuenta que células acinares de ratas con PA han demostrado no liberar ICAM-1 desde membrana, y los leucocitos circulantes sobreexpresaron ICAM-1 a partir de las 6 h de inducir PA por TcNa, el incremento de ICAM-1 observado en plasma desde estadios tempranos de la PA debe proceder de la superficie de células endoteliales vasculares de páncreas y pulmón. Por otra parte, hay que hacer notar que los niveles plasmáticos de ICAM-1 no se redujeron ni por el

tratamiento con NAC ni con Dx, a pesar de que diferentes parámetros de diagnóstico revelaron reducir la severidad de ambos modelos de PA. Este hecho lleva a descartar la valoración de los niveles de ICAM-1 en plasma como parámetro indicativo de la severidad de la enfermedad. Esta conclusión está apoyada por los resultados obtenidos por Pezilli y cols., 2008, quienes no detectaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ICAM-1 entre pacientes con PA medias y severas.

Numerosos cambios inmunológicos se han asociado con la patogénesis de la PA, que incluyen leucocitosis (Pezzilli y cols., 1995; de Dios y cols., 2002a; Ueda y cols., 2006), alteración de las proporciones relativas de las distintas poblaciones leucocitarias (Hatano y cols., 2001; de Dios y cols., 2002a; Pietruczuk y cols., 2006; Ueda y cols., 2006), y cambios dinámicos en la respuesta inflamatoria de los leucocitos circulantes, que producen factores pro- y anti-inflamatorios en cantidades variables dependiendo de la severidad y el estadio de la PA (de Dios y cols., 2002a; Ramudo y cols., 2005b). Nuestros resultados mostraron una reducción del número total de leucocitos en respuesta a los tratamientos con NAC y Dx. Sin embargo ni la neutrofilia, ni la linfopenia que ocurre durante la PA en buena parte como resultado de una muerte celular por apoptosis (Takeyama y cols., 2000), pudieron ser revertidas por los tratamientos. La Dx, pero no la NAC, redujo a valores normales el incremento de monocitos circulantes observado en ambos modelos de PA.

NAC y Dx inhibieron asimismo la respuesta pro-inflamatoria en monocitos circulantes, un efecto que podría ser ejercido por represión de la síntesis de citocinas a nivel transcripcional, dado que ambos tratamientos han demostrado interferir con la activación de NF- κ B y STAT. La respuesta inflamatoria incrementada durante la PA, podría relacionarse con el descenso de expresión de CD45 observado en leucocitos circulantes de ambos modelos de PA. CD45 es una proteína tirosina fosfatasa de transmembrana, que ha demostrado jugar un papel inmunomodulador en linfocitos (Wroblewski y Hamann, 1997), microglía (Townsend y cols., 2004) y células acinares (de Dios y cols., 2005). Aunque su expresión en células acinares ha demostrado ser dependiente de mecanismos oxidativos (de Dios y cols., 2006), el tratamiento antioxidante no recuperó los niveles de CD45 de la membrana leucocitaria. Por el contrario, la administración de Dx aumentó significativamente la expresión de CD45 en PA inducida por OBP. Otras fosfatasas, como MKP-1, han demostrado ser sobreexpresadas en macrófagos (Bhattacharyya y cols., 2007) y mastocitos (Kassel y cols., 2001) pre-estimulados con LPS en respuesta a la Dx. Todos estos datos sugieren

que la sobreexpresión de fosfatasa podría ser uno de los mecanismos utilizados por los glucocorticoides para ejercer su efecto anti-inflamatorio. No obstante, el hecho de que el tratamiento profiláctico no ejerza ningún efecto sobre los valores de CD45, sugiere que los mecanismos inflamatorios asociados con la PA e involucrados en la represión de CD45 deben desencadenarse para que la Dx, administrada después de inducir la PA, pueda activar a nivel transcripcional la expresión de CD45 en leucocitos circulantes.

Los análisis de factores inflamatorios en pulmón de ratas con PA, indicaron sobreexpresión de las quimiocinas MCP-1 y CINC y de las moléculas de adhesión P-selectina e ICAM-1, alcanzando niveles similares en ambos modelos de PA. Excepto ICAM-1, cuya expresión parece no depender de los mecanismos sensibles a estrés oxidativo, el resto de las moléculas inflamatorias se redujeron en respuesta a la administración de NAC en PA inducida por OBP, pero no en la inducida por TcNa. Este resultado lo explicamos por el hecho de que, teniendo en cuenta los resultados de MPO en pulmón, el aporte de ROS por parte de los neutrófilos infiltrados, es menor en la PA menos severa. En consecuencia, la capacidad del antioxidante sería apropiada para balancear el estrés oxidativo en pulmón en el caso de PA inducida por OBP, pero se vería superada en PA inducida por TcNa por una sobreproducción de ROS, que por actuar como estimulantes de las rutas de señalización de la cascada inflamatoria, mantendrían activos los mecanismos de síntesis de factores inflamatorios.

La administración profiláctica o terapéutica de Dx, reprimió la expresión pulmonar de quimiocinas e ICAM-1 y, aunque sin inhibir totalmente, redujo significativamente la expresión de P-selectina en ambos modelos de PA, un resultado que confirma que además de los mecanismos dependientes del estado redox, citocinas circulantes pueden activar la transcripción de quimiocinas y moléculas de adhesión. Sin embargo, según los resultados de MPO, la Dx no fue capaz de reducir la infiltración de neutrófilos en pulmón. Estos resultados sugieren que P-selectina podría jugar un papel en el “rolling” de leucocitos, pero moléculas diferentes de ICAM-1 parecen ser requeridas para la trans migración de leucocitos al pulmón. En esta misma línea, Folch y colaboradores (Folch y cols., 1999), reportaron que la inmunoneutralización de ICAM-1 resultó ineficaz para prevenir la infiltración pancreática y pulmonar de neutrófilos en ratas con PA inducida por TcNa al 5 %, mientras que se redujo significativamente por el bloqueo de P-selectina. En contraste, el daño pulmonar en ratas con PA inducida por ceruleína o por CDE, aunque no completamente prevenido, resultó menor en ratones knock-out para ICAM-1 (Frossard y cols., 1999) y en animales

pretratados con anticuerpo monoclonal contra ICAM-1 (Werner y cols., 1999; Lundberg y cols., 2001). Todos estos datos sugieren que ICAM-1 puede jugar un papel diferente en los distintos modelos experimentales de PA.

Por otra parte resultó sorprendente que la Dx, utilizada como fármaco anti-inflamatorio, lejos de reducir la infiltración leucocitaria en pulmón, incluso la agravó cuando se administró después de inducir la PA. Estos resultados están en línea con los reportados por Ramsay y colaboradores (Ramsay y cols., 1998), quienes demostraron una marcada infiltración de neutrófilos en ratas tratadas con Dx. Tampoco la terapia con Dx fue capaz de reprimir la infiltración leucocitaria en pulmón de ratones infectados con virus H5N1 (Xu y cols., 2009). En la misma línea, estudios *in vitro* mostraron que la Dx aumentó la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular de pulmón humano inducida por TNF- α (Matsuda y cols., 2008). Por tanto, de alguna manera, la Dx podría generar un ambiente pro-adherente de forma específica en los capilares de las vías aéreas.

Tratamientos bloqueantes de la acción de quimiocinas (Bhatia y cols., 2000b y 2005; Bhatia y Hegde, 2007) y moléculas de adhesión (Werner y cols., 1998; Yokomura y cols., 2001) han demostrado reducir la severidad de la PA. Los resultados obtenidos en este estudio con el tratamiento anti-inflamatorio, que en vez de bloquear reprime la expresión local y sistémica de factores inflamatorios, apoya este hecho.

La administración de Dx redujo las alteraciones morfológicas y funcionales acaecidas en el páncreas como consecuencia de la PA. La administración profiláctica o terapéutica de Dx, redujo la necrosis pancreática en PA severa. También disminuyó la infiltración leucocitaria y el edema, con la consiguiente reducción en los valores de hematocrito. Sin embargo, el hecho de que en PA severa sólo mejoraran estos parámetros con la administración profiláctica de Dx, sugiere que alteraciones vasculares tales como vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular, que favorecen el paso transcapilar de plasma y la diapédesis de leucocitos, no puedan impedirse cuando dichas alteraciones son severas si la Dx se administra 1 h después de la PA. Además, la Dx preservó en cierta medida la función pancreática exocrina, como lo demuestra la significativa reducción de la amilasemia. Estos resultados podrían deberse a los efectos protectores atribuidos a los glucocorticoides, tales como una reducción de alteraciones en la microcirculación (Leach y cols., 1991) y estabilización de proteínas de citoesqueleto (Castellino y cols., 1992). Además, por sus efectos inmunomoduladores, la Dx redujo significativamente la leucocitosis, la monocitosis y la citoquinemia que

caracteriza a la PA. Sin embargo, a pesar de reducir los factores inflamatorios circulantes, la respuesta inmune sistémica y la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en pulmón, no fue capaz de impedir la infiltración leucocitaria en pulmón.

Por el contrario, el tratamiento con NAC demostró que, aunque no fuera capaz de reprimir la expresión de quimiocinas e ICAM-1 en tejido pancreático, redujo asimismo la severidad de la PA, por proteger las distintas estructuras celulares de daños oxidativos y por reducir el efecto quimioatrayente ejercido por los ROS. Además de mejorar la funcionalidad de la glándula (como lo indica la reducción en la amilasemia), redujo las alteraciones histológicas de la glándula, incluso de una forma más acusada que la Dx, como lo evidencia la reducción del edema, de la infiltración leucocitaria, de la vacuolización y de la necrosis acaecida en el páncreas e hígado de PA severa. A esto hay que añadir que NAC, a diferencia de la Dx, resultó eficaz para reducir la infiltración leucocitaria pulmonar en PA de severidad media.

Dado que los ROS no sólo ejercen directamente daños oxidativos sobre estructuras celulares, sino que además actúan como segundos mensajeros en rutas de señalización de la cascada inflamatoria, la administración de NAC resultó altamente eficaz para reducir la severidad de la PA por reunir propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias.

6. Conclusiones

1. Mediante la activación de p38-MAPK, NF- κ B y STAT3, mecanismos oxidativos son responsables de desencadenar, desde estadíos iniciales de la pancreatitis aguda, la expresión de quimiocinas en células acinares, pero no en células extra-acinares del páncreas de rata.
2. Pancreatitis aguda inducida en la rata por obstrucción biliopancreática o por TcNa (3,5 %), cursa con una expresión diferencial de moléculas de adhesión en el páncreas: ausencia de P-selectina y sobreexpresión de ICAM-1.
3. Mecanismos independientes del estado redox regulan en la rata la expresión de ICAM-1 en páncreas, leucocitos circulantes y pulmón durante la pancreatitis edematosa inducida por obstrucción biliopancreática y la necrotizante inducida por TcNa (3,5 %).
4. Por una ruta independiente de la MAPKs, la dexametasona reprime la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión en la célula acinar, mediante la reducción de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3.
5. Independientemente de la severidad de la pancreatitis aguda, la respuesta inflamatoria de células acinares y extra-acinares del páncreas de rata fue igualmente sensible a la acción inmunomoduladora de la dexametasona.
6. La represión de la respuesta inmune periférica con dexametasona, atenuó el daño pancreático y hepático, pero no limitó la extensión del daño inflamatorio a pulmón ni en pancreatitis aguda moderada ni en pancreatitis aguda severa.
7. ICAM-1 no juega un papel importante en el proceso de infiltración de leucocitos en tejido pancreático y pulmonar en la rata con pancreatitis aguda inducida por obstrucción biliopancreática o por TcNa (3,5 %).
8. En contraste con quimiocinas (MCP-1 y CINC) o ICAM-1, la expresión de P-selectina en pulmón de ratas con pancreatitis aguda resultó más resistente a la acción inmunosupresora de la dexametasona.
9. Limitar la producción de ROS mediante la administración de N-Acetilcisteína, resultó más beneficioso para reducir la severidad de la pancreatitis aguda que reprimir la expresión de factores inflamatorios pancreáticos y sistémicos con dexametasona.

7. Bibliografía

Abate C, Patel L, Rauscher FJ, Curran T. (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249: 1157-1162. PMID: 2118682.

Abe R, Shimosegawa T, Kimura K, Abe T, Kashimura J, Koizumi M, Toyota T. (1995). The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 109: 933-943. PMID: 7544752.

Adams DH, Lloyd AR. (1997). Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 349: 490-495. PMID: 9040590.

Adcock IM, Shirasaki H, Gelder CM, Peters MJ, Brown CR, Barnes PJ. (1994). The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life Sci*. 55: 1147-1153. PMID: 8090056.

Adib-Conquy M, Cavaillon JM. (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 101: 36-47. PMID: 19132187.

Aggarwal BB. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 3: 745-756. PMID: 12949498.

Aho HJ y Nevalainen TJ. (1980). Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol*. 15: 417-424. PMID: 7433904.

Aho HJ, Suonpää K, Ahola RA, Nevalainen TJ. (1984). Experimental pancreatitis in the rat. Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *Exp Pathol*. 25: 73-79. PMID: 6539232.

Al Mofleh IA. (2008). Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 14: 675-684. PMID: 18205255.

Albelda SM, Smith CW, Ward PA. (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*. 8: 504-512. PMID: 8181668.

Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. (1995). Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 10599-10603. PMID: 7479848.

Angel P, Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1072: 129-157. PMID: 1751545.

Argent BE, Smith RK, Case MR, Case MR. The role of calcium in pancreatic enzyme and electrolyte secretion. Stimulus-secretion coupling in the gastrointestinal tract. *Deneef P, Hokin LE. eds*. 1976: 237-250.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 270: 286-290. PMID: 7569976.

Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. (1995). Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*. 269: 1727-1730. PMID: 7569902.

Baczako K, Bültmann B, Younes M, Gasper M, Kirchmayr R, Beger HG. (1991). The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis. *Klin Wochenschr*. 69: 1025-1031. PMID: 1798275.

Baeuerle PA, Henkle T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 58: 1-27. PMID: 8011280.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 55: 97-179. PMID: 8304236.

Bannister AJ, Cook A, Kouzarides T. (1991). In vitro DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene*. 6: 1243-1250. PMID: 1907361.

Barnes PJ, Adcock I. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 14: 436-441. PMID: 7510080.

Barnes PJ. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*. 94: 557-572. PMID: 9854452.

Barnes PJ. (1997). Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 10: 3-19. PMID: 9344828.

Barrett TD, Yan W, Freedman JM, Lagaud GJ, Breitenbucher JG, Shankley NP. (2008). Role of CCK and potential utility of CCK1 receptor antagonism in the treatment of pancreatitis induced by biliary tract obstruction. *Br J Pharmacol*. 153: 1650-1658. PMID: 18297100.

Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56: 335-344. PMID: 2644044.

Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P. (1999). Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas*. 18: 371-377. PMID: 10231842.

Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, Vogt SK, Muglia LJ. (2007). Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood*. 109: 4313-4319. PMID: 17255352.

Bhatia M, Brady M, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. (1999). Effect of cerulein on chemokine production from cultured rat pancreatic acini. *Pancreas*. Vol 19, No 4.

Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J. (2002). MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282: G77-85. PMID: 11751160.

Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. (2000a). Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 190: 117-125. PMID: 10657008.

Bhatia M, Brady M, Zagorski J, Christmas SE, Campbell F, Neoptolemos JP, Slavin J. (2000b). Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut*. 47: 838-844. PMID: 11076884.

Bhatia M, Hegde A. (2007). Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Regul Pept*. 138: 40-48. PMID: 17014919.

Bhatia M, Proudfoot AE, Wells TN, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. (2003). Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis. *Br J Surg*. 90: 698-704. PMID: 12808617.

Bhatia M, Ramnath RD, Chevali L, Guglielmotti A. (2005). Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. G1259–G1265. PMID: 15691869.

Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Frossard JL, Lee HS, Castagliuolo I, Wang CC, Gerard N, Porthoulakis C, Steer ML. (1998). Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4760-4765. PMID: 9539812.

Bhatia M. (2005). Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scand J Surg*. 94: 97-102. PMID: 16111089.

Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. (1996). In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol*. 157: 1630-1637. PMID: 8759749.

Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. (2003). Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med*. 11: 229-234. PMID: 12525883.

Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic M, Livingston E, Pandol SJ, Gukovskaya AS. (2000). Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279, C1993–C2003. PMID: 11078716.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. (1997). Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 112: 235-243. PMID: 9228382.

Bradley EL. (1993). A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11-13, 1992. *Arch Surg.* 128: 586-590. PMID: 8489394.

Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. (2002). Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas.* 25: 260-269. PMID: 12370537.

Braganza JM, Scott P, Bilton D, Schofield D, Chaloner C, Shiel N, Hunt LP, Bottiglieri T. (1995). Evidence for early oxidative stress in acute pancreatitis. Clues for correction. *Int J Pancreatol.* 17: 69-81. PMID: 8568337.

Bülbüller N, Doğru O, Umac H, Gürsu F, Akpolat N. (2005). The effects of melatonin and pentoxifylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 11: 108-114. PMID: 15877240.

Burke TR Jr, Zhang ZY. (1998). Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers.* 47: 225-241. PMID: 9817026.

Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. (1995). Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 9: 401-412. PMID: 7659084.

Camps M, Nichols A, Arkinstall S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14: 6-16. PMID: 10627275.

Carballo M, Conde M, El Bekay R, Martín-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirín J, Conde J, Bedoya FJ, Sobrino F. (1999). Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem.* 274: 17580-17586. PMID: 10364193.

Carrier HM, Koelsche GA, Prickman LE, Maytum CK, Lake CF, Williams HL. (1950). The effect of cortisone on bronchial asthma and hay fever occurring in subjects sensitive to ragweed pollen. *J Allergy.* 21: 282-287. PMID: 15428180.

Cassatella MA. (1998). The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res.* 28: 148-161. PMID: 9801925.

Castellino F, Heuser J, Marchetti S, Bruno B, Luini A. (1992). Glucocorticoid stabilization of actin filaments: a possible mechanism for inhibition of corticotropin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 3775–3779. PMID: 1315038.

Chao KC, Chao KF, Chuang CC, Liu SH. (2006). Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis in vivo. *Br J Surg.* 93: 332-338. PMID: 16392107.

Chen LF, Greene WC. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 392-401. PMID: 15122352.

Chiari H. (1896). Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z Heilkunde.* 17: 69-95.

Chipitsyna G, Gong Q, Gray CF, Haroon Y, Kamer E, Arafat HA. (2007). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 expression by angiotensin II in the pancreatic islets and beta-cells. *Endocrinology.* 148: 2198-2208. PMID: 17303665.

Choudhury GG, Ghosh-Choudhury N, Abboud HE. (1998). Association and direct activation of signal transducer and activator of transcription1alpha by platelet-derived growth factor receptor. *J Clin Invest.* 101: 2751-2760. PMID: 9637709.

Closa D, Bardají M, Hotter G, Prats N, Gelpí E, Fernández-Cruz L, Roselló-Catafau J. (1996). Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol.* 270 (1 Pt 1): G6-13. PMID: 8772495.

Closa D, Bulbena O, Hotter G, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L, Gelpí E. (1994). Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 102: 167-170. PMID: 7528065.

Closa D, Hotter G, Bulbena O, Gelpi E, Rosello-Catafau J. (1996). Calcium channel blockers in experimental acute pancreatitis: effect on tissue prostanoids and oxygen free radicals. *Pancreas.* 12: 178-182. PMID: 8720666.

Colomb E, Figarella C. (1979). Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim Biophys Acta.* 571: 343-351. PMID: 508771.

Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, Moshage H. (2006). Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol.* 44: 918-929. PMID: 16310883.

Cosen-Binker LI, Gaisano HY. (2007). Recent insights into the cellular mechanisms of acute pancreatitis. *Can J Gastroenterol*. 21: 19-24. PMID: 17225878.

Cotgreave IA. (1997). N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 38: 205-227. PMID: 8895810.

Czakó L, Takács T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. (1998). Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 43: 1770-1777. PMID: 9724167.

da Silva CP, Guse AH. (2000). Intracellular Ca(2+) release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochim Biophys Acta*. 1498: 122-133. PMID: 11108956.

Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. (2000). Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 21: 376-384. PMID: 11075992.

Dabrowski A, Gabryelewicz A, Chyczewski L. (1991). The effect of platelet activating factor antagonist (BN 52021) on cerulein-induced acute pancreatitis with reference to oxygen radicals. *Int J Pancreatol*. 8: 1-11. PMID: 2033314.

Dabrowski A, Gabryelewicz A, Chyczewski L. (1995). The effect of platelet activating factor antagonist (BN 52021) on acute experimental pancreatitis with reference to multiorgan oxidative stress. *Int J Pancreatol*. 17: 173-180. PMID: 7542692.

Dabrowski A, Groblewski GE, Schafer C, Guan KL, Williams JA. (1997). Cholecystokinin and EGF activate MAPK cascade by different mechanisms in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*. 273: C1472-1479. PMID: 9374631.

Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. (1996). Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 271: 5686-5690. PMID: 8621433.

Dabrowski A. Exocrine pancreas; molecular basis for intracellular signaling, damage and protection. (2003). Polish experience. *J Physiol Pharmacol*. 3: 167-181. PMID: 15075471.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1415-1421. PMID: 8197455.

Davies MG, Hagen PO. (1997). Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg*. 84: 920-935. PMID: 9240130.

de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon CH. (1996). Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg*. 83: 349-353. PMID: 8665189.

de Dios I, Perez M, de La Mano A, Sevillano S, Orfao A, Ramudo L, Manso MA. (2002a). Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. *Cytokine*. 20: 295-303. PMID: 12633572.

de Dios I, Ramudo L, Alonso JR, Recio JS, Garcia-Montero AC, Manso MA. (2005). CD45 expression on rat acinar cells: involvement in pro-inflammatory cytokine production. *FEBS Lett*. 579: 6355-6360. PMID: 16263122.

de Dios I, Ramudo L, García-Montero AC, Manso MA. (2006). Redox-sensitive modulation of CD45 expression in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis. *J Pathol*. 210: 234-239.

de Dios I, Uruñuela A, Orfao A, Manso MA. (2002b). Cholecystokinin antagonist L364,718 induces alterations in acinar cells that prevent improvement of acute pancreatitis induced by obstruction. *Dig Dis Sci*. 47: 1800-1809. PMID: 12184533.

DeFrances CJ, Hall MJ. (2007). 2005 National Hospital Discharge Survey. *Adv Data*. 385: 1-19. PMID: 17691217.

de la Torre-Prados MV, Herce-Muñoz MA, Morell-Ocaña M, Rius-Díaz F, García Alcántara A. (2001). *Pancreatology*. 1: 129-199.

De-Madaria E, Soler G, Martínez J, Gómez-Escolar L, Sanchez-Fortun C, Sempere L, López- Font I, Pérez J, Pérez-Mateo M. (2009). Update of the Atlanta Classification of Severity of Acute Pancreatitis: Should a Moderate Category Be Included?. *Pancreatology*. 9: 427-543.

Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine O, Devière J. (2000). N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas*. 20: 161-169. PMID: 10707932.

Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, Norman J. (1997). Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology*. 113: 1741-1746. PMID: 9352880.

Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol*. 11: 2804-2811. PMID: 1901948.

Devrière J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, Cohard M. (2001). Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology*. 120: 498-505. PMID: 11159890.

Diamond MS, Springer TA. (1993). A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol*. 120: 545-556. PMID: 7678422.

Didonato JA, Saatcioglu F, Karin M. (1996). Molecular mechanisms of immunosuppression and anti-inflammatory activities by glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 154: S11-15. PMID: 8756781.

Dunn JA, Li C, Ha T, Kao RL, Browder W. (1997). Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor-alpha gene expression during acute biliary pancreatitis. *Am Surg*. 63: 1036-1043. PMID: 9393250.

Dustin ML, Springer TA. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*. 341: 619-624. PMID: 2477710.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*. 7: 663-698. PMID: 1809356.

Emanuelli G, Montrucchio G, Dughera L, Gaia E, Lupia E, Battaglia E, De Martino A, De Giuli P, Gubetta L, Camussi G. (1994). Role of platelet activating factor in acute pancreatitis induced by lipopolysaccharides in rabbits. *Eur J Pharmacol*. 261: 265-272. PMID: 7813547.

Emanuelli G, Montrucchio G, Gaia E, Dughera L, Corvetti G, Gubetta L. (1989). Experimental acute pancreatitis induced by platelet activating factor in rabbits. *Am J Pathol*. 134: 315-326. PMID: 2464939.

Escobar J, Pereda J, Arduini A, Sandoval J, Sabater L, Aparisi L, López-Rodas G, Sastre J. (2009a). Cross-talk between oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in acute pancreatitis: a key role for protein phosphatases. *Curr Pharm Des*. 15: 3027-3042. PMID: 19754377.

Escobar J, Pereda J, Arduini A, Sandoval J, Sacilotto N, Sabater L, Aparisi L, López-Rodas G, Sastre J. (2009b). Role of SER/THR Phosphatase PP2A in Acute Pancreatitis: the Mechanism Behind Pentoxifylline Treatment. *Pancreatology*. 9: 427-543.

Feddersen CO, Barth P, Püchner A, von Wichert P. (1993). N-acetylcysteine decreases functional and structural, ARDS-typical lung changes in endotoxin-treated rats. *Med Klin (Munich)*. 88: 197-206. PMID: 8492774.

Ferrell JE Jr. (1996). MAP kinases in mitogenesis and development. *Curr Top Dev Biol.* 33: 1-60. PMID: 9138904.

Fialkow L, Chan CK, Rotin D, Grinstein S, Downey GP. (1994). Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J Biol Chem.* 269: 31234-31242. PMID: 7983067.

Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ. (1988). Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen-1. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 369: 293-298. PMID: 3202969.

Fink GW, Norman JG. (1997). Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin-1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine.* 9: 1023-1027. PMID: 9417814.

Fisher CJ Jr, Opal SM, Lowry SF, Sadoff JC, LaBrecque JF, Donovan HC, Lookabaugh JL, Lemke J, Pribble JP, Stromatt SC. (1994). Role of interleukin-1 and the therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in sepsis. *Circ Shock.* 44: 1-8. PMID: 7704933.

Fleischer F, Dabew R, Göke B, Wagner AC. (2001). Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 7: 259-265. PMID: 11819771.

Folch E, Prats N, Hotter G, López S, Gelpi E, Roselló-Catafau J, Closa D. (2000). P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 45: 1535-1544. PMID: 11007102.

Folch E, Salas A, Panés J, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Anderson DC, Navarro S, Piqué JM, Fernández-Cruz L, Closa D. (1999). Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg.* 230: 792-799. PMID: 10615934.

Formela LJ, Wood LM, Whittaker M, Kingsnorth AN. (1994). Amelioration of experimental acute pancreatitis with a potent platelet-activating factor antagonist. *Br J Surg.* 81: 1783-1785. PMID: 7827939.

Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, White RH. (2006). The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas* 33: 336-344. PMID: 17079936.

Frossard JL, Pastor CM. (2002). Experimental acute pancreatitis: new insights into the pathophysiology. *Front Biosci.* 7: d275-287. PMID: 11779694.

Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. (1999). The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology*. 116: 694-701. PMID: 10029629.

Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. (2008). Acute pancreatitis. *Lancet*. 371: 143-152. PMID: 18191686.

Gaisano HY. (2000). A hypothesis: SNARE-ing the mechanisms of regulated exocytosis and pathologic membrane fusions in the pancreatic acinar cell. *Pancreas*. 20: 217-226. PMID: 10766446.

Garcia-Montero AC, Manso MA, Rodriguez AI, De Dios I. (1994). Therapeutic and protective effect of subcutaneous injections of L-364,718 on caerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas*. 9: 309-315. PMID: 7517544.

Geokas MC, Baltaxe HA, Banks PA, Silva JJ, Frey CF. (1985). Acute pancreatitis. *Ann Intern Med*. 103: 86-100. PMID: 3890660.

Gerard C, Frossard JL, Bhatia M, Saluja A, Gerard NP, Lu B, Steer M. (1997). Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Invest*. 100: 2022-2027. PMID: 9329966.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 16: 225-260. PMID: 9597130.

Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, Garcia S, Christa L, Smith A, Tebar L, Hunt SP, Bayne R, Smith AJ, Dagorn JC, Closa D, Iovanna JL. (2007). Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut*. 56: 1091-1097. PMID: 17409121.

Gomez G, Townsend CM Jr, Green D, Rajaraman S, Uchida T, Thompson JC. (1989). Involvement of cholecystokinin receptors in the adverse effect of glucocorticoids on diet-induced necrotizing pancreatitis. *Surgey*. 106: 230-236; PMID: 2474863.

Gordon D, Calne RY. (1972). Renal failure in acute pancreatitis. *Br Med J*. 3: 801-802. PMID: 5076254.

Gourmala NG, Buttin M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. (1997). Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J. Neuroimmunol*. 74: 35-44. PMID: 9119977

Grady T, Dabrowski A, Williams JA, Logsdon CD. (1996). Stress-activated protein kinase activation is the earliest direct correlate to the induction of secretagogue-induced pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 227: 1-7. PMID: 8858094.

Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. (1997). Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 113: 1966-1975. PMID: 9394737.

Granger J, Remick D. (2005). Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock*. 24 Suppl 1: 45-51. PMID: 16374372.

Grendell JH. (1990). Idiopathic acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 19: 843-848. PMID: 2269520.

Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. (1994). Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg*. 167: 214-218. PMID: 8311136.

Griesbacher T, Rainer I, Heinemann A, Groisman D. (2005). Haemodynamic and exocrine effects of caerulein at submaximal and supramaximal levels on the rat pancreas: role of cholecystokinin receptor subtypes. *Pancreatology*. 6: 65-75. PMID: 16327284.

Griesbacher T. (2000). Kallikrein-kinin system in acute pancreatitis: potential of B₂-bradykinin antagonists and kallikrein inhibitors. *Pharmacology*. 60: 113-120. PMID: 10754447.

Gross V, Andreesen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, Farthmann EH, Scholmerich J. (1992). Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest*. 22: 200-203. PMID: 1582445.

Guice KS, Miller DE, Oldham KT, Townsend CM Jr, Thompson JC. (1986). Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis. *Am J Surg*. 151: 163-169. PMID: 2418699.

Gukovskaya A, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gokovsky S, Pandol SJ. (1997). Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*. 100: 1853-1862. PMID: 9312187.

Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. (2002). Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 122: 106-118. PMID: 11781286.

Gukovsky I, Gukovskaya A, Blinman T, Zaninovic V, Pandol SJ. (1998). Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol*. 275: G1402-G1414. PMID: 9843778.

Gukovsky I, Reyes C, Zaninovic, Wong F, Gukovskaya AS, Pandol SJ. (2000). Improvement of experimental pancreatitis with pharmacologic inhibitors of NF- κ B AND AP-1 Activation. *Pancreas*. 21: 4.

Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. (2003). Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284: G85-95. PMID: 12488237.

Gutmann I, Wahlefeld AW. (1974). L-(+)-lactato determination with lactatodehydrogenase and NAD. In Methods of enzymatic analysis. (Bergmeyer HU, ed.). New York, Academic Press Inc, pp 1464-1468.

Gupta RK. (1971). Immunohistochemical study of glomerular lesions in acute pancreatitis. *Arch Pathol*. 92: 267-272. PMID: 4937537.

Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedele B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. (2000). Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 106: 773-781. PMID: 10995788.

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*. 55: 917-924. PMID: 3142692.

Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 91: 14S-22S. PMID: 1928205.

Hammond CL, Lee TK, Ballatori N. (2001). Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol*. 34: 946-954. PMID: 11451183.

Hanada T, Yoshimura A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13: 413-421. PMID: 12220554.

Hatano N, Sugiyama M, Watanabe T, Atomi Y. (2001). Opsonin receptor expression on peritoneal exudative and circulatory neutrophils in murine acute pancreatitis. *Pancreas*. 23: 55-61. PMID: 11451148.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. (2004). *Genes Dev*. 18: 2195-2224. PMID: 15371334.

Hietaranta AJ, Aho HJ, Nevalainen TJ. (1993). Pancreatic phospholipase A2 in cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*. 14: 261-267. (1993). PMID: 8113628.

Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. (2001). Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 388-395. PMID: 11162528.

Hickson JC. (1970). The secretion of pancreatic juice in response to stimulation of the vagus nerves in the pig. *J Physiol* 206: 275-297. PMID: 5498476.

Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima T, Okamoto K, Ogawa M. (2000). Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* 21: 141-146. PMID: 10975707.

Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. (1998). Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol.* 275 (2 Pt 1): G352-362. PMID: 9688663.

Höfken T, Keller N, Fleischer F, Göke B, Wagner AC. (2000). Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 680-685. PMID: 11027531.

Hohmann HP, Remy R, Pöschl B, van Loon AP. (1990). Tumor necrosis factors-alpha and -beta bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF-kappa B at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding. *J. Biol. Chem.* 265: 15183-15188. PMID: 2168404.

Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science.* 265: 1701-1706. PMID: 8085155.

Hu X, Li WP, Meng C, Ivashkiv LB. (2003). Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol.* 170: 4833-4839. PMID: 12707366.

Hughes CB, El-Din AB, Kotb M, Gaber LW, Gaber AO. (1996a). Calcium channel blockade inhibits release of TNF-alpha and improves survival in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas.* 13: 22-28. PMID: 8783330.

Hughes CB, Grewal HP, Gaber L, Kotb M, El-Din AB, Mann L, Gaber AO. (1996b). Anti-TNF alpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg.* 171: 274-280. PMID: 8619467.

Ismail G, Moganroth ML, Todd RF, Boxer LA. (1987). Prevention of pulmonary injury in isolated perfused rat lungs by activated human neutrophils preincubated with anti-Mol monoclonal antibody. *Blood.* 69: 1167-1172. PMID: 3030466.

Janssen YM, Heintz NH, Mossman BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by N-acetyl-L-cysteine in mesothelial cells. *Cancer Res.* 55: 2085-2089, 1995. PMID: 7743507.

Johnson CD. (1999). Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis. *Dig Surg.* 16: 93-101. PMID: 10207233.

Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Krüger B, Adler G. (1995). Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am J Physiol.* 268 (2 Pt 1): G328-338. PMID: 7864130.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 382: 174-177. PMID: 8700209.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. (1997). *Curr Opin Cell Biol.* 9: 240-246. PMID: 9069263.

Karin M. (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 351: 127-134. PMID: 8650258.

Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 20: 7108-7116. PMID: 11742987.

Kay J, Kassell B. The autoactivation of trypsinogen. (1971). *J Biol Chem.* 246: 6661-6665. PMID: 5167250.

Keceli M, Kucuk C, Sozuer E, Kerek M, Ince O, Arar M. (2005). The effect of interleukin-10 on acute pancreatitis induced by cerulein in a rat experimental model. *J Invest Surg.* 18: 7-12. PMID: 15804946.

Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B. (2003). Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. *FEBS Lett.* 546: 1-5. PMID: 12829228.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257. PMID: 4561027.

Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. (2000). Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med.* 29: 674-683. PMID: 11033420.

Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Shin DM, Muallem S, Lee MG. (2002). Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-

dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 122: 1941-1953. PMID: 12055600.

Kimura T, Zuidema GD, Cameron JL. (1980) Acute pancreatitis. Experimental evaluation of steroid, albumin and trasyolol therapy. *Am J Surg*. 140: 403-408. PMID: 6158881.

Koiwai T, Oguchi H, Kawa S, Yanagisawa Y, Kobayashi T, Homma T. (1989). The role of oxygen free radicals in experimental acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol*. 5: 135-143. PMID: 2480983.

Kong F, Guo X, Noel JG, Wells DA, Lovell GJ, Ogle CK. (2002). Thermal injury-induced increases of hepatocyte SOCS3 lead to decreases in STAT3. *Shock*. 18: 374-379. PMID: 12392283.

Korc M, Bailey AC, Williams JA. (1981). Regulation of protein synthesis in normal and diabetic rat pancreas by cholecystokinin. *Am J Physiol*. 241: G116-G121. PMID: 6791509.

Kribben A, Tyrakowski T, Schulz I. (1983). Characterization of Mg-ATP-dependent Ca²⁺ transport in cat pancreatic microsomes. *Am J Physiol*. 244: G480-490. PMID: 6133452.

Krüger B, Albrecht E, Lerch MM. (2000). The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol*. 157: 43-50. PMID: 10880374.

Kyriakis JM, Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869. PMID: 11274345.

Kyriakis JM, Avruch J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*. 271: 24313-24316. PMID: 8798679.

Lankisch PG, Droge M, Gottesleben F. (1995). Drug induced acute pancreatitis: incidence and severity. *Gut*. 37: 565-567. PMID: 7489946.

Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Rober HA, McFadden DW. (2001). Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res*. 99: 365-370. PMID: 11469912.

Lee YW, Hennig B, Toborek M. (2003). Redox-regulated mechanisms of IL-4-induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 284: H185-H192. PMID: 12388243.

Lerch MM, Adler G. (1994). Experimental animal models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 15: 159-170. PMID: 7930776.

Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Rückauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Schölmerich J. (1991). Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 101: 782-785. PMID: 1907253.

Letoha T, Somlai C, Takács T, Szabolcs A, Rakonczay Z Jr, Jármay K, Szalontai T, Varga I, Kaszaki J, Boros I, Duda E, Hackler L, Kurucz I, Penke B. (2005). The proteasome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 39: 1142-1451. PMID: 16214030.

Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?. (1999). *FASEB J* 13: 1137-1143. PMID: 10385605.

Li YH, Huang ZW, Xue P, Guo J, He FQ, You Z, Wang ZR. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. (2008). Effects of Chaiqin Chengqi Decoction on activation of nuclear factor-kappaB in pancreas of rats with acute necrotizing pancreatitis. *Chinese*. 6: 180-184. PMID: 18241655.

Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. (2003). Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 9: 2513-2518. PMID: 14606087.

Lium B, Ruud TE, Pillgram-Larsen J, Stadaas JO, Aasen AO. (1987). Sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in pigs. Pathomorphological studies of the pancreas in untreated animals and animals pretreated with high doses of corticosteroids or protease inhibitors. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A*. 95: 377-382. PMID: 3687441.

Logsdon CD. (1986). Stimulation of pancreatic acinar cell growth by CCK, epidermal growth factor, and insulin *in vitro*. *Am J Physiol*. 251: G487-G494. PMID: 3020992.

Long J, Song N, Liu XP, Guo KJ, Guo RX. (2005). Nuclear factor-kappaB activation on the reactive oxygen species in acute necrotizing pancreatitis rats. *World J Gastroenterol*. 11: 4277-4280. PMID: 16015706.

Lüthen R, Niederau C, Grendell JH. (1995). Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Am J Physiol*. 268: G592-G604. PMID: 7537455.

Lüthen R, Owen RL, Sarbia M, Grendell JH, Niederau C. (1998). Premature trypsinogen activation during cerulein pancreatitis in rats occurs inside pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 17: 38-43. PMID: 9667518.

Lund H, Tønnesen H, Tønnesen MH, Olsen O. (2006). Long-term recurrence and death rates after acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 41: 234-238. PMID: 16484129.

Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO. (2001). Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg.* 233: 213-220. PMID: 11176127.

Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. (2005). Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res.* 54: 522-527. PMID: 16389574.

Machelska H, Brack A, Mousa SA, Schopohl JK, Rittner HL, Schäfer M, Stein C. (2004). Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 142: 772-780. PMID: 15159283.

Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. (2002). *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 9: 401-410. PMID: 12483260.

Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. (1997). Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 272: 24684-24690. PMID: 9305939.

Marshall JB. (1993). Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med.* 153: 1185-1198. PMID: 8494472.

Masamune A, Hakomori S, Igarashi Y. (1995). N,N,N-trimethylsphingosine inhibits interleukin-1 beta-induced NF-kappa B activation and consequent E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* 367: 205-259. PMID: 7540991.

Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. (2002). Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 36-42. PMID: 12065697.

Masamune A, Sakai Y, Yoshida M, Satoh A, Satoh K, Shimosegawa T. (2001). Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF-kappaB and AP-1 in AR42J cells. *Dig Dis Sci.* 46: 1871-1881. PMID: 11575438.

Masamune A, Shimosegawa T, Kimura K, Fujita M, Sato A, Koizumi M, Toyota T. (1999). Specific induction of adhesion molecules in human vascular endothelial cells by rat experimental pancreatitis-associated ascitic fluids. *Pancreas.* 18: 141-150. PMID: 10090411.

Masamune A, Suzuki N, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. (2006) Curcumin blocks activation of pancreatic acinar cells. *J. Cell. Biochem.* 97: 1080–1093. PMID: 16294327.

Matsuda A, Orihara K, Fukuda S, Fujinaga H, Matsumoto K, Saito H. (2008). Corticosteroid enhances TNF- α -mediated leukocyte adhesion to pulmonary microvascular endothelial cells. *Allergy*. 63: 1610-1616. PMID: 19032233.

Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. (2000). Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 47: 546-552. PMID: 10986216.

McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 8: 1775-1789. PMID: 16987031.

McFadden DW. (1991). Organ failure and multiple organ system failure in pancreatitis. *Pancreas*. 6: S37-S43. PMID: 1788251.

Melis M, Pace E, Siena L, Spatafora M, Tipa A, Profita M, Bonanno A, Vignola AM, Bonsignore G, Mody CH, Gjomarkaj M. (2003). Biologically active intercellular adhesion molecule-1 is shed as dimers by a regulated mechanism in the inflamed pleural space. *Am J Respir Crit Care Med*. 167: 1131-1138. PMID: 12574075.

Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J*. 12: 2005-2015. PMID: 8491191.

Michalski CW, Gorbachevski A, Erkan M, Reiser C, Deucker S, Bergmann F, Giese T, Weigand M, Giese NA, Friess H, Kleeff J. (2007). Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *J Transl Med*. 5: 63. PMID: 18053242.

Mitchell CJ, Playforth MJ, Kelleher J, McMahon MJ. (1983). Functional recovery of the exocrine pancreas after acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 18: 5-8. PMID: 6609418.

Mithofer K, Fernández-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. (1995). Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology*. 109: 239-246. PMID: 7540999.

Monto GL, Guillan RA, Lee SH, Watanabe I. (1983). Assessment of corticosteroid treatment of ethionine pancreatitis in the rabbit. *Am J Gastroenterol*. 2: 63-67. PMID: 6337475.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19: 683-765. PMID: 11244051.

Mordelet E, Davies HA, Hillyer P, Romero IA, Male D. (2007). Chemokine transport across human vascular endothelial cells. *Endothelium*. 14: 7-15. PMID: 17364892.

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 178: 449-460. PMID: 8340753.

Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA. (1992). Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest.* 90: 1600-1607. PMID: 1383277.

Murakami H, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H. (1995). Detection of O₂-generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotizing pancreatitis. *Surgery.* 118: 547-554. PMID: 7652692.

Murayama KM, Drew JB, Nahrwold DL, Joehl RJ. (1990). Cholecystokinin antagonist prevents hyperamylasemia and improves pancreatic exocrine function in caerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas.* 5: 439-444. PMID: 1696383.

Murphy PM. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Ann Rev Immunol.* 12: 593-633. PMID: 8011292.

Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. (2003). Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg.* 7: 20-25. PMID: 12559181.

Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6493-6498. PMID: 10829066.

Niederau C, Borchard F, Lüthen R, Niederau M. (1996). Early development of experimental biliary pancreatitis and its amelioration by CCK-receptor blockade. *Hepatogastroenterology.* 43: 1442-1453. PMID: 8975946.

Niederau C, Frohnhoffs C, Schulz HU. (1995). Active pancreatic digestive enzymes show striking differences in their potential to damage isolated rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med.* 125: 265-275. PMID: 7844475.

Niederau C, Niederau M, Borchard F, Ude K, Lüthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH. (1992). Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis. *Pancreas.* 7: 486-496. PMID: 1641391.

Noelting G, Bernfeld P. Sur les enzymes amylolytiques III. (1948). La alpha amylase, dosage d'activité et controle de l'absence de beta amylase. *Helv Chim Acta.* 31: 286-290. PMID: 18912399.

Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. (1990). Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems. *Digestion*. 47: 130-137. PMID: 2083799.

Norman J. (1998). The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 175: 76-83. PMID: 9445247.

Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. (1997). Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci*. 42: 1783-1788. PMID: 9286248.

Norman JG, Fink GW, Franz MG. (1995a). Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*. 130: 966-970. PMID: 7661681.

Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. (1995b). Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. *Ann Surg*. 221: 625-631. PMID: 7794067.

Northrup WF, Simons RL. (1972). Pancreatic trauma: a review. *Surgery*. 71: 27-43. PMID: 4550235.

Ohmoto K, Yamamoto S. (2005). Serum interleukin-6 and interleukin-10 in patients with acute pancreatitis: clinical implications. *Hepatogastroenterology*. 52: 990-994. PMID: 16001614.

Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. (1998). A monoclonal anti-interleukin-8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *Gut*. 43: 232-239. PMID: 10189850.

Pandol SJ, Periskic S, Gukovsky I, Zaninovic V, Jung Y, Zong Y, Solomon TE, Gukovskaya AS, Tsukamoto H. (1999). Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. *Gastroenterology*. 117: 706-716. PMID: 10464148.

Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. (2007). Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology*. 132: 1127-1251. PMID: 17383433.

Pariente JA, Camello C, Camello PJ, Salido GM. (2001). Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J Membr Biol*. 179: 27-35. PMID: 11155207.

Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. (2003). Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 9: 2266-2269. PMID: 14562390.

Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. (2006). Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem*. 13: 2775-2787. PMID: 17073628.

Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gómez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerdá M, Lledó S, Viña J, Sastre J. (2004). Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann Surg*. 240: 108-116. PMID: 15213626.

Pereda J, Sandoval J, Ardiuni A, Escobar J, Doménech E, Royo D, Rodríguez JL, Sabater L, Aparisi L, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. (2006). Role of Oxidative Stress in the Inflammatory Response in Taurocholate-Induced Necrotizing Acute Pancreatitis. *Pancreatology*. 6: 33-56.

Pereira C, Ferreira C, Carvalho C, Oliveira C. (1996). Contribution of plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases to the synaptosomal $(\text{Ca}^{2+})_i$ increase during oxidative stress. *Brain Res*. 713: 369-377. PMID: 8725000.

Pezzilli R, Billi P, Beltrandi E, Maldini M, Mancini R, Morselli Labate AM, Miglioli M. (1995). Circulating lymphocyte subsets in human acute pancreatitis. *Pancreas*. 11: 95-100. PMID: 7667248.

Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. (1997). Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 42: 1469-1472. PMID: 9246048.

Pezzilli R, Corsi MM, Barassi A, Morselli-Labate AM, D'Alessandro A, Dogliotti G, Fantini L, Malesci A, Corinaldesi R, Melzi d'Eril G. (2008). Serum adhesion molecules in acute pancreatitis: time course and early assessment of disease severity. *Pancreas*. 37: 36-41. PMID: 18580442.

Pezzilli R, Miniero R, Cappelletti O, Barakat B. Serum interleukin 6 in the prognosis of acute biliary pancreatitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 30: 291-294, 1998. PMID: 9759598.

Pietruczuk M, Dabrowska MI, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Dabrowski A. (2006). Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 12: 5344-5351.

Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nüssler AK, Schoenberg M, Beger HG. (1999). The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in

experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Lett.* 461: 268-272. PMID: 10567709.

Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. (2003). Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.* 37: 263-236. PMID: 12960727.

Prezioso VR, Darnell JE Jr. (2003). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science.* 257: 744-745. PMID: 1496401.

Proost P, Struyf S, Van Damme J. (2006). Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochem Soc Trans.* 34: 997-1001. PMID: 17073736.

Rahman A, Kefer J, Bando M, Niles WD, Malik AB. (1998). E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. *Am J Physiol.* 275: L533-L544. PMID: 9728048.

Rakonczay Z Jr, Duda E, Kaszaki J, Iványi B, Boros I, Lonovics J, Takács T. (2003). The anti-inflammatory effect of methylprednisolone occurs down-stream of nuclear factor-kappaB DNA binding in acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 464: 217-227. PMID: 12620516.

Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. (2008). The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 57: 259-267. PMID: 17675325.

Ramnath RD, Bhatia M. (2006). Substance P treatment stimulates chemokine synthesis in pancreatic acinar cells via the activation of NF-kappaB. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291 G1113–G1119. PMID: 16873895.

Ramnath RD, Sun J, Adhikari S, Zhi L, Bhatia M. (2008). Role of PKC-delta on substance P-induced chemokine synthesis in pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294: C683–C692. PMID: 18160487.

Ramnath RD, Sun J, Adhikari S, Bhatia M. (2007). Effect of mitogen-activated protein kinases on chemokine synthesis induced by substance P in mouse pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med.* 11: 1326-1341. PMID: 18205703.

Ramudo L, De Dios I, Yubero S, Vicente S, Manso MA. (2007). ICAM-1 and CD11b/CD18 expression during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction: effect of N-acetylcysteine. *Exp Biol Med.* 232: 737-743. PMID: 17526765.

Ramudo L, Manso MA, de Dios I. (2005a). Biliary pancreatitis-associated ascitic fluid activates de production of tumor necrosis factor-alpha in acinar cells. *Crit Care Med.* 33: 143-148. PMID: 15644661.

Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, de Dios I. (2005b). Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol.* 206: 9-16. PMID: 15761843.

Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I. (2005c). Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine.* 32: 125-131. PMID: 16263306.

Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Vicente S, De Dios I. (2009). Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med.* 13: 1314-1320. PMID: 19604316.

Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Sanchez-Recio J, Weruaga E, De Dios I. (2010a). Effect of dexamethasone on peripheral blood leukocyte immune response in bile pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Steroids.* (in press).

Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Sanchez-Recio J, Weruaga E, De Dios I. (2010b). Effects of dexamethasone on ICAM-1 expression and inflammatory response in necrotizing acute pancreatitis in rats. *Pancreas Journal.* (in press).

Ramsay PL, Piedboeuf B, Gamache M, Geske RS, Smith CV, Welty SE. (1998). Dexamethasone enhancement of hyperoxic lung inflammation in rats independent of adhesion molecule expression. *Biochem Pharmacol.* 56: 259-268. PMID: 11211915.

Raraty MG, Murphy JA, Mcloughlin E, Smith D, Criddle D, Sutton R. (2005). Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. *Scand J Surg.* 94: 89-96. PMID: 16111088.

Rau B, Paszkowski A, Lillich S, Baumgart K, Möller P, Beger HG. (2001). Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. *Lab Invest.* 81: 1001-1013. PMID: 11451152.

Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nüssler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. (2000). Ann Surg. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?. 231: 352-360. PMID: 10714628.

Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grunert A, Beger HG. (1997). The potential role of procalcitonin and interleukin-8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut.* 41: 832-840. PMID: 9462219.

Rau BM, Krüger CM, Schilling MK. (2005). Anti-cytokine strategies in acute pancreatitis: pathophysiological insights and clinical implications. *Rocz Akad Med Bialymst.* 50: 106-115. PMID: 16358948.

Ray A, Prefontaine KE. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 752-756. PMID: 8290595.

Reinheckel T, Prause J, Nedeleev B, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W. (1999). Oxidative stress affects pancreatic proteins during the early pathogenesis of rat caerulein pancreatitis. *Digestion.* 60: 56-62. PMID: 9892799.

Rinderknecht H. (1988). Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol.* 3: 105-112. PMID: 2834471.

Robinson K, Vona-Davis L, Riggs D, Jackson B, McFadden D. (2006). Peptide YY attenuates STAT1 and STAT3 activation induced by TNF-alpha in acinar cell line AR42J. *J Am Coll Surg.* 202: 788-796. PMID: 16648019.

Rogatsky I, Ivashkiv LB. (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens.* 68: 1-12. PMID: 16774534.

Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. (1997). Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology.* 112: 960-967. PMID: 9041259.

Rosen HR, Tüchler H. (1992). Pulmonary injury in acute experimental pancreatitis correlates with elevated levels of free fatty acids in rats. *HPB Surg.* 6: 79-90. PMID: 1284032.

Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. (1988). Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol.* 141: 1665-1669. PMID: 3137261.

Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. (1999). Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol.* 276 (4 Pt 1): G835-842. PMID: 10198325.

Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zavertnik A, Sengupta A, Steer ML. (1989). Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc Natl Acad Sci.* 86: 8968-8971. PMID: 2479032.

Samuel I, Yorek MA, Zaheer A, Fisher RA. (2006). Bile-pancreatic juice exclusion promotes Akt/NF-kappaB activation and chemokine production in ligation-induced acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg.* 10: 950-959. PMID: 16843865.

Sandoval J, Escobar J, Pereda J, Sacilotto N, Rodriguez JL, Sabater L, Aparisi L, Franco L, López-Rodas G, Sastre J. (2009). Pentoxifylline prevents loss of PP2A phosphatase

activity and recruitment of histone acetyltransferases to proinflammatory genes in acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 331: 609-617. PMID: 19671881.

Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. (1984). The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg.* 200: 405-413. PMID: 6207783. 1984

Sankaran H, Goldfine ID, Bailey A, Licko V, Williams JA. (1982). Relationship of cholecystokinin receptor binding to regulation of biological functions in pancreatic acini. *Am J Physiol.* 242: G250-G257. PMID: 6175228.

Satake K, Shim K, Soh S, Yamamoto T, Nishiwaki H, Umeyama K. (1988). Serial histologic study of the development, progression, and healing of acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 3: 166-173. PMID: 2453873.

Satoh A, Masamune A, Kimura K, Kaneko K, Sakai Y, Yamagiwa T, Satoh M, Kikuta K, Asakura T, Shimosegawa T. (2003). Nuclear factor kappa B expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* 26: 350-356. PMID: 12717267.

Schäfer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. (1998). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem.* 273: 24173-8. PMID: 9727040.

Schäfer C, Williams JA. (2000). Stress kinases and heat shock proteins in the pancreas: possible roles in normal function and disease. *J Gastroenterol.* 35: 1-9. PMID: 10632533.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 270: 283-286. PMID: 7569975.

Schenk H, Klein M, Erdbrügger W, Dröge W, Schulze-Osthoff K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 1672-1676. PMID: 8127864.

Schindler C, Darnell JE Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 64: 621-651. PMID: 7574495.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science.* 257: 809-813. PMID: 1496401.

Schmidt WE, Meyer-Alber A, Waschulewski IH, Fetz I, Höcker M, Kern HF, Fölsch UR. (1994). Serine/threonine phosphatases play a role in stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells. *Z Gastroenterol.* 32: 226-231. PMID: 7517088.

Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG. (1994). Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 41: 313-319. PMID: 7959564.

Schoenberg MH, Büchler M, Gaspar M, Stinner A, Younes M, Melzner I, Bültmann B, Beger HG. (1990). Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut*. 31: 1138-1143. PMID: 1707389.

Schölmerich J. (1996). Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 219: 37-42. PMID: 8865470.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic.Res. Commun*. 17: 221–237. PMID: 1473734.

Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. (1999). Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 46: 2736-2750. PMID: 10576339.

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. (1993). Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*. 365: 654-657. PMID: 8413628.

Sevillano S, de la Mano AM, De Dios I, Ramudo L, Manso MA. (2003a). Major pathological mechanisms of acute pancreatitis are prevented by N-acetylcysteine. *Digestion*. 68: 34-40. PMID: 12949437.

Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, De Dios I. (2003b). N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*. 1639: 177-184. PMID: 14636949.

Sheffner AL. (1963). The reduction *in vitro* in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. *Ann N Y Acad Sci*. 106: 298-310. PMID: 13977050.

Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. (2005a). Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology*. 5: 492-500. PMID: 16020935.

Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang X, Andersson R. (2006). Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 41: 472-480. PMID: 16635917.

Shi C, Zhao X, Wang X, Andersson R. (2005b). Role of nuclear factor-kappaB, reactive oxygen species and cellular signaling in the early phase of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 40: 103-108. PMID: 15841722.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 405-455. PMID: 7888182.

Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy DE. (1993). Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science.* 261: 1736-1739. PMID: 8378775.

Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. (1998). Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 275(6 Pt 1): C1640-1652. PMID: 9843726.

Sjövall S, Holmin T, Evander A, Stenram U. (1988). Splenic and gastro-duodenal vein occlusion--influence on the pancreatic gland and on the outcome of experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol.* 3: 143-149. PMID: 2452221.

Sledziński Z, Woźniak M, Brunelli A, Lezoche E, Scutti G, Kossowska E, Jankowski K, Stanek A, Bertoli E. (2000). Experimental pancreatitis induced by synthetic prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *Pancreas.* 20: 146-151. PMID: 10707929.

Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M. (1989). Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev.* 3 (12B): 2091-2100. PMID: 2516828.

Smith RD, Raraty M, Criddle DN, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Neoptolemos JP, Petersen OH, Sutton. (2005). Effects of Calcium on Zymogen Activation in Mouse Pancreatic Acinar Cells. *Pancreatology.* 5 (suppl 1): 35-102.

Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. (2002). Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283: G1166-G1174. PMID: 12381531.

Springer TA. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 57: 827-872. PMID: 7778885.

Stadman ER. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 797-821. PMID: 8352601.

Steer ML, Rutledge PL, Powers RE, Saluja M, Saluja AK. (1991). The role of oxygen-derived free radicals in two models of experimental acute pancreatitis: effects of catalase, superoxide dismutase, dimethylsulfoxide, and allopurinol. *Klin Wochenschr.* 69: 1012-1017. PMID: 1724678.

Steinberg W, Tenner S. (1994). Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 330: 1198-1210. PMID: 7811319.

Stephenson HE Jr, Pfeffer RB, Saypol GM. (1952). Acute hemorrhagic pancreatitis; report of a case with cortisone treatment. *AMA Arch Surg.* 2: 307-308. PMID: 14943366.

Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. (2007). Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem.* 282: 4021–4034. PMID: 17095510.

Strähle U, Schmid W, Schütz G. (1988). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* 7: 3389-3395. PMID: 2463158.

Sun J, Bhatia M. (2007). Blockade of neurokinin-1 receptor attenuates CC and CXC chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292: G143-G153. PMID: 16873893.

Tabernero L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlacsek SE. (2008). Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J.* 275: 867-882. PMID: 18298793.

Takahashi H, Tsuda Y, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. (2006). CCL2 as a trigger of manifestations of compensatory anti-inflammatory response syndrome in mice with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Leukoc Biol.* 79: 789-796. PMID: 16434696.

Takahira R, Yonemura K, Fujise Y, Hishida A. (2001). Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: the possible role of nitroxyl. *Free Radic Biol Med.* 31: 809-815. PMID: 11557319.

Takaoka K, Kataoka K, Sakagami J. (2002). The effect of steroid pulse therapy on the development of acute pancreatitis induced by closed duodenal loop in rats. *J Gastroenterol.* 37: 537-542. PMID: 12162

Takeda K, Akira S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses, Cytokine Growth Factor Rev. 11: 199-207. PMID: 10817963.

Tanaka N, Murata A, Uda K, Toda H, Kato T, Hayashida H, Matsuura N, Mori T. (1995). Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Crit Care Med.* 23: 901-908. PMID: 7736749.

Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. (1990). New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci.* 35: 367-374. PMID: 2307082.

Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Rozé C. (2001). Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res.* 96: 56-67. PMID: 11180997.

Tietze F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and others tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522. PMID: 4388022.

Toskes PP. (1990). Hyperlipidemic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 19: 783-791. PMID: 2269517.

Tsurumi C, Ishida N, Tamura T, Kakizuka A, Nishida E, Okumura E, Kishimoto T, Inagaki M, Okazaki K, Sagata N. (1995). Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol Cell Biol.* 15: 5682-5687. PMID: 7565719.

Turnley AM, Bartlett PF. (2000). Cytokines that signal through the leukemia inhibitory factor receptor-beta complex in the nervous system. *J Neurochem.* 74: 889-899. PMID: 10693919.

Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. (2006). Immunosuppression in patients with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol.* 41: 779-784. PMID: 16988767.

Unal E, Uzun H, Kusaslan R, Dogan M, Genc H, Gunes P, Titiz I. (2005). Serum paraoxonase (a high-density lipoprotein-associated lipophilic antioxidant) activity and lipid profile in experimental acute pancreatitis. *Pancreas.* 31: 84-87. PMID: 15968253.

Uruñuela A, Manso MA, de la Mano AM, Sevillano S, Orfao A, de Dios I. (2002a). Asynchronous impairment of calcium homeostasis in different acinar cells after pancreatic duct obstruction in rat. *Clin Sci.* 102: 615-622. PMID: 12049614.

Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. (2002b). Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta.* 1588: 159-64. PMID: 12385780.

Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL, Natarajan V. (2003). Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 5: 723-773. PMID: 14588145.

van de Stolpe A, Caldenhoven E, Raaijmakers JA, van der Saag PT, Koenderman L. (1993). Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 8: 340-347. PMID: 8095395.

Van Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, Goldman M, Robberecht P, Velu T, Devière J. (1995). Interleukin-10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 108: 1917-1922. PMID: 7539389.

Van Snick J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 8: 253-278. PMID: 2188664.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5: 392-399. PMID: 14732063.

Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya A, Pandol SJ. (2001). Localized pancreatic NF- κ B activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol.* 280: G1197-G1208. PMID: 11352813.

Viedma JA, Pérez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. (1992). Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut.* 33: 1264-1267. PMID: 1427382.

Virlos IT, Mason J, Schofield D, McCloy RF, Eddleston JM, Siriwardena AK. (2003). Intravenous n-acetylcysteine, ascorbic acid and selenium-based anti-oxidant therapy in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 38: 1262-1267. PMID: 14750647.

von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. (1995). A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell.* 82: 989-999. PMID: 7553859.

Vona-Davis LC, Frankenberry KA, Waheed U, Peterson E, McFadden DW. (2005). Expression of STAT3 and SOCS3 in pancreatic acinar cells. *J Surg Res.* 127: 14-20. PMID: 15893771.

Wagner AC, Mazzucchelli L, Miller M, Camoratto AM, Göke B. (2000). CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278: G165-G172. PMID: 10644575.

Wagner AC, Metzler W, Höfken T, Weber H, Göke B. (1999). P38 map kinase is expressed in the pancreas and is immediately activated following cerulein hyperstimulation. *Digestion.* 60: 41-47. PMID: 9892797.

Wakao H, Gouilleux F, Groner B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.* 13: 2182-2191. PMID: 7514531.

Waldner H. Vascular mechanisms to induce acute pancreatitis. (1992). *Eur Surg Res. Suppl* 1: 62-67. PMID: 1601025.

Wang ZF, Liu C, Lu Y, Dong R, Xu J, Yu L, Yao YM, Liu QG, Pan CE. (2004). Dexamethasone and dextran 40 treatment of 32 patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 10: 1333-1336. PMID: 15112353.

Wang B, Zhang P, Wei Q. (2008). Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Sci China C Life Sci.* 51: 487-494. PMID: 18488168.

Ward JB, Sutton R, Jenkins SA, Petersen OH. (1996). Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 111: 481-491. PMID: 8690215.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell.* 82: 241-50. PMID: 7543024.

Wereszczynska-Siemiatkowska U, Dabrowski A, Jedynak M, Gabryelewicz A. (1998). Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis (AP): its correlation with serum phospholipase A₂ (PLA₂) and plasma polymorphonuclear elastase (PMN-E) in different-severity forms of human AP. *Pancreas.* 17: 163-168. PMID: 9700948.

Wereszczynska-Siemiatkowska U, Siemiatkowski A, Kaminski K, Dabrowski A, Gabryelewicz A, Laszewicz W. (2000). Serum soluble E-selectin is an early marker of severe acute pancreatitis. *Pancreas.* Vol 21, No 4.

Werner J, Hartwig W, Schmidt E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. (1998). Reduction of local and systemic complications of acute pancreatitis by monoclonal antibody to ICAM-1. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 115: 725-729. PMID: 14518349.

Werner J, Z'graggen K, Fernández-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. (1999). Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg.* 229: 834-842. PMID: 10363897.

Whitcomb DC. (1999). Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut.* 45: 317-322. PMID: 10446089.

Willemer S, Bialek R, Adler G. (1990). Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in caerulein-pancreatitis. *Histochemistry*. 94: 161-170. PMID: 2358374.

Wiseman H, Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 313 (Pt 1): 17-29. PMID: 8546679.

Wolffe AP. (1997). Transcriptional control. Sinful repression. *Nature*. 387: 16-17. PMID: 9139815.

Wroblewski M, Hamann A. (1997). CD45-mediated signals can trigger shedding of lymphocyte L-selectin. *Int Immunol*. 9: 555-562. PMID: 9138016.

Wung BS, Ni CW, Wang DL. (2005). ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells. *J Biomed Sci*. 12: 91-101. PMID: 15864742.

Xiping Z, Ruiping Z, Binyan Y, Li Z, Hanqing C, Wei Z, Rongchao Y, Jing Y, Wenqin Y, Jinjin B. (2010). Protecting effects of a large dose of dexamethasone on spleen injury of rats with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 25: 302-308. PMID: 19874442.

Yadav D, Lowenfels AB. (2006). Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas*. 33: 323-330. PMID: 17079934.

Yan HC, Delisser HM, Pilewski JM, Barone KM, Szklut PJ, Chang XJ, Ahern TJ, Langer-Safer P, Albelda SM. (1994). Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-selectin. *J Immunol*. 152: 3053-3063. PMID: 7511636.

Yang J, Murphy C, Denham W, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. (1999). Evidence of a central role for p38 map kinase induction of tumor necrosis factor alpha in pancreatitis-associated pulmonary injury. *Surgery*. 126: 216-222. PMID: 10455887.

Yang R, Uchiyama T, Alber SM, Han X, Watkins SK, Delude RL, Fink MP. (2004). Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med*. 32: 1453-1459. PMID: 15241088.

Yang X, Chen Y, Gabuzda D. (1999). ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 274: 27981-27988. PMID: 10488148.

Yokomura I, Iwasaki Y, Nagata K, Nakanishi M, Natsuhara A, Harada H, Kubota Y, Ueda M, Inaba T, Nakagawa M. (2001). Role of intercellular adhesion molecule 1 in acute lung injury induced by candidemia. *Exp Lung Res.* 27: 417-431. PMID: 11480583.

Yu JH, Kim KH, Kim H. (2006). Suppression of IL-1beta expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol.* 72: 1555-1562. PMID: 16934228.

Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. (2002). Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest.* 82: 1359-1368. PMID: 12379770.

Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. (2009a). Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 1792: 1205-1211. PMID: 19818401.

Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. (2009b). Targeting peripheral immune response reduces the severity of necrotizing acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 37: 240-245, 2009. PMID: 19050604.

Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. (2009c). The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 1792: 148-154. PMID: 19111613.

Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ. (2000). Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: G666-676. PMID: 11005752.

Zhang XP, Chen L, Hu QF, Tian H, Xu RJ, Wang ZW, Wang KY, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. (2007a). Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 13: 5506-5511. PMID: 17907297.

Zhang XP, Zhang L, Wang Y, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. (2007b). Study of the protective effects of dexamethasone on multiple organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *JOP.* 8: 400-412. PMID: 17625291.

Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem.* 272: 30607-30610. PMID: 9388192.

Zhao H, Chen JW, Zhou YK, Zhou XF, Li PY. (2003). Influence of platelet activating factor on expression of adhesion molecules in experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 9: 338-341. PMID: 12532462.

Zhao X, Dib M, Wang X, Widegren B, Andersson R. (2005). Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury. *Lung*. 183: 253-264. PMID: 16211461.

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 264: 95-98. PMID: 8140422.

Zhong DJ, Zhao XY, Hao J, Guo H. (2009). The role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 in injury of alveolar type II epithelial cells of rat with severe acute pancreatitis in vitro. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 21: 107-110. PMID: 19220965.

Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. (1992). Role of platelet-activating factor in pancreatitis-associated acute lung injury in the rat. *Am J Pathol*. 140: 971-979. PMID: 1562055.